Spermabeurteilung mit Hilfe der Biolumineszenzmessung von ATP, ADP und AMP

Wilfried Berger

Diss. München
1984

Univ. Illinois Bkt.

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Professor Dr. W. Leidl
und dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch e.V.
Leitender fachtechnischer Direktor: Dr.Rudolf Hahn

Spermabeurteilung mit Hilfe der Biolumineszenzmessung von ATP, ADP und AMP

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians - Universität München

von
Wilfried Berger
aus
Lichtenau

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv.Doz. Dr. Dr.habil. F. Graf

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534920_0046

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Literatur	2
2.1.	Parameter zur Spermabeurteilung	2
2.2.	Die Adenosinnucleotide	3
2.2.1.	ATP, ADP und AMP als meßbare Parameter des Spermienstoffwechsels	5
2.2.2.	Bestimmung der Adenosinnucleotide	6
2.2.3.	Adenylsäure-Energie-Ladung	6
2.3.	Die Biolumineszenz	7
3.	Material und Methode eigener Untersuchungen	1o
3.1.	Untersuchungsmaterial	1o
3.1.1.	Spermagewinnung	1o
3.1.2.	Voruntersuchung des Spermas	11
3.1.3.	Verdünnung und Konfektionierung	12
3.1.4.	Abkühlen und Adaption	13
3.1.5.	Tiefgefrieren und Wiederauftauen	13
3.2.	Messung und Errechnung des ATP-, ADP und AMP-Gehaltes im Sperma	14
3.2.1.	Meßprinzip	14
3.2.2.	Meßgerät	14
3.2.3.	Meßreagenzien	15
3.2.4.	Vorbereitung der Spermaproben für die Biolumineszenz-Messung	17
3.2.5.	Messung	17
3.2.5.1.	Messung der ATP-Lumineszenz in erhitztem Sperma	17
3.2.5.2.	Bestimmung des ADP in erhitztem Sperma	18
3.2.5.3.	AMP-Bestimmung in erhitztem Sperma	19
3.2.5.4.	Errechnung des ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes in erhitztem Sperma	2o
3.2.6.	Angewandte statistische Methoden	22

4.	Ergebnisse	23
4.1.	Adenosinnucleotide	23
4.1.1.	Adenosintriphosphat (ATP)	23
4.1.2.	Adenosindiphosphat (ADP)	24
4.1.3.	Adenosinmonophosphat (AMP)	25
4.1.4.	"Adenylate energy charge" (AEC)	26
4.2.	Schätz- und Meßwerte der übrigen Parameter	27
4.2.1.	Ejakulatvolumen	27
4.2.2.	Dichte im Nativsperma	27
4.2.3.	Motilität (prozentualer Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien)	27
4.2.4.	Non Return-Ergebnisse (NRR 6o/90)	28
4.3.	Non Return-Ergebnisse in Beziehung zu den einzelnen Schätz- und Meßwerten der übrigen Parameter	29
4.3.1.	Non Return-Rate (NRR) und Adenylsäure-Energie-Ladung (AEC)	29
4.3.1.1.	NRR und AEC-Differenz	29
4.3.1.2.	NRR und AEC im nativen Ejakulat	32
4.3.1.3.	NRR und AEC im Sperma nach Tiefgefrierkonservierung und Wiederauftauen	32
4.3.1.4.	NRR und AEC im wiederaufgetauten Tiefgefriersperma nach Inkubation	37
4.3.2.	Non Return-Rate (NRR) und Adenosinnucleotide	4o
4.3.2.1.	NRR und Adenosintriphosphat (ATP)	4o
4.3.2.2.	NRR und Adenosindiphosphat (ADP)	4o
4.3.2.3.	NRR und Adenosinmonophosphat (AMP)	4o
4.3.3.	Non Return-Rate (NRR) im Verhältnis zu den übrigen Parametern des Spermas	41
4.3.3.1.	NRR und Dichte im Nativsperma	41
4.3.3.2.	NRR und Motilität im Nativejakulat	41
4.3.3.3.	NRR und Motilität nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen	42

4.3.3.4. NRR und Motilität nach Inkubation 42
4.3.3.5. NRR und Ejakulatvolumen 43
4.3.4. Non Return-Rate und vererbter Zuchtwert (Laktationsleistung) 44
5. Diskussion 45
6. Zusammenfassung 5o
7. Summary 51
8. Tabellenanhang 52
9. Literaturverzeichnis 75
Lebenslauf

1. Einleitung

Eine gründliche Spermauntersuchung ist die Voraussetzung für die Tiefgefrierkonservierung.
Die Spermabeurteilung erfolgt bislang, mit Ausnahme der beiden meßbaren Kriterien Ejakulatvolumen und Nativ-Dichte, nur nach subjetkiven Schätzwerten, vor allem nach dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien.
Biochemische Analyseverfahren zur Erfassung der Stoffwechselvorgänge blieben Einzeluntersuchungen im Labor vorbehalten.
Seit es nun (PFETSCH 1979, KÄHN 1981 a,b) gelungen ist, eine relativ einfache Biolumineszenz-Methode zu entwickeln, mit der in kurzer Zeit und ohne großen apparativen Aufwand der Adenosin-Nucleotid-Gehalt in den Spermien zu ermitteln ist, steht ein objektiv meßbarer Parameter zur Verfügung. Dieser verdient umsomehr Interesse, da wie bereits von mehreren Autoren (FOULKES und MACDONALD 1979, LEIDL 1980) berichtet, der Adenosintriphosphat-Gehalt in den Spermien eine enge Beziehung zu den Motilitäts-Schätzwerten aufweist.
Es galt daher zu prüfen, ob sich die Messung von Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) als Routinemethode für die Spermabeurteilung in Besamungszentralen eignet. Dazu sollte untersucht werden, inwieweit die Meßergebnisse für ADP und AMP die Aussage des ATP-Wertes unterstützen oder ob der "Adenylate energy charge" (AEC) nach der Definition von ATKINSON und WALTON (1967) die energetische Situation der Spermien, wie von SWEDES et al. (1975) behauptet, besser wiedergibt, als die Anteile der einzelnen Adenosin-Nucleotide.

2. Literatur

2.1. Parameter zur Spermabeurteilung

In der spermatologischen Diagnostik stehen zur Untersuchung der Motilität und der Morphologie von Samenzellen sowie von biochemischen Vorgängen zahlreiche Methoden zur Verfügung, die zuverlässige Indikatoren für die Samenqualität liefern (MANN und LUTWAK-MANN 1981).
Die Motilität der Spermien ist mit das wichtigste Merkmal bei der routinemäßigen Beurteilung einer Samenprobe. Sie wird seit den Anfängen der künstlichen Besamung in praxi subjektiv geschätzt.
Viele Untersuchungen beschäftigen sich seit Jahren mit dem Problem, diesen Parameter durch objektive Methoden zu bestimmen. Für die Beurteilung der Massenbewegung seien z.B. die Messung mit dem "Sperm Motility Analyzer" (BARTOOV et al. 1981) und die Messung der "area change frequency" mit einem "image analysing computer" (DOTT und FOSTER 1979) genannt.
Zur objektiven Messung der Vorwärtsbewegung der Spermien werden photographische Methoden (MÜLLER und SZILAGYI 1964, REVELL und WOOD 1978) sowie das von STEINER et al. (1980) beschriebene Verfahren der Motilitätsmessung mit Hilfe der Laser-Doppler Spektroskopie angewandt. Darüber hinaus gibt die Untersuchung der Spermien auf morphologische Anomalien oder Schädigungen Aufschluß über Qualität und Befruchtungsvermögen. Zum Beispiel ist ein vermehrtes Auftreten von Samenzellen mit Schäden am apikalen Rand der Kopfkappe ein deutlicher Hinweis auf mindere Qualität bzw. Schädigung.

Neben Motilität und Morphologie können meßbare Vorgänge im Spermienstoffwechsel zur Beurteilung der Spermienvitalität und des Befruchtungsvermögens des Spermas herangezogen werden.
Durch die von PFETSCH (1979) und KÄHN (1981 a) entwickelte Methode zur Ermittlung des ATP-Gehaltes in den Spermien haben Messungen des Sauerstoffverbrauchs der Samenzellen, der Glykolyserate sowie der Aktivität der verschiedenen Enzyme in den Spermien und dem sie umgebenden Seminalplasma an Bedeutung verloren. Das bereits in der Einleitung erwähnte parallele Verhalten von Motilität (Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien) und ATP-Gehalt der Samenzellen läßt diesen Parameter besonders interessant erscheinen.

2.2. Die Adenosinnucleotide

Für den Energiestoffwechsel der Spermatozoen sind die Adenosinnucleotide von zentraler Bedeutung.
Die energiereiche Ausgangsform, das ATP, wird von den Mitochondrien an der Basis des Spermienschwanzes gebildet und liefert die Energie für die Spermienbewegung (SATIR 1979). Der Transport des ATP vom Mittelstück zum Spermienschwanz, wo es gelagert und verbraucht wird, erfolgt durch Diffusion (NEVO und RIKMENSPOEL 1969).
Katalysiert durch die ATP-ase Dynein, wird das Adenosintriphosphat unter Abspaltung je einer Phosphatgruppe zu ADP und in einem weiteren Schritt zu AMP dephosphoryliert (GIBBONS und GIBBONS 1979).
Dabei wird chemische Energie frei, die durch, dem Myosin

des Muskels ähnliche, kontraktile Elemente in mechanische Energie umgewandelt wird (MACHIN 1958).
Die Microtubuli des Spermienschwanzes gleiten aneinander vorbei und bewirken so die Schlängelbewegung des Flagellums (GIBBONS und GIBBONS 1979).
Die Schlagfrequenz wird durch die Konzentration des Adenosintriphosphates bestimmt (AMELAR et al. 1980).
Gleichzeitig wird in der Mitochondrienhülle des Mittelstückes ATP durch Phosphorylierung von AMP und ADP resynthetisiert (NEVO und RIKEMENSPOEL 1969).
Die erforderliche Energie wird durch Fruktolyse und Respiration gewonnen.
Unter anaeroben Bedingungen werden durch die Fruktolyse pro Mol Fruktose 2 Mol ATP und 2 Mol Milchsäure erzeugt. Steht genügend Sauerstoff zur Verfügung, kann neben der Fruktolyse ein Abbau der Substrate durch Respiration erfolgen. Bei der sogenannten exogenen Respiration werden Substanzen aus der Spermienumgebung wie z.B. Glukose, Fruktose und Mannose zur Energiegewinnung herangezogen. Spermieneigene Lipide und Proteine liefern die Grundlage für die "endogene" Respiration.
Auf diesem, energetisch wesentlich günstigeren, Weg entstehen, pro Mol Fruktose, 38 Mol ATP (SALISBURY und VANDEMARK 1961). Ein Teil des zusätzlichen Energiegewinns wird zur Rephosphorylierung von ATP verwendet (SALISBURY und VANDEMARK 1961, MANN 1964, BUDDECKE 1974, KARLSON 1974).
Die Adenosinnucleotide stellen, wie bei anderen stoffwechselaktiven Zellen, auch bei den Spermien das Energiereservoir dar und haben auf das Befruchtungsvermögen großen Einfluß (KÄHN et al. 1982 a).
Der Gehalt der Adenosinnucleotide in den Samenzellen gibt daher Aufschluß über den augenblicklichen Stoffwechselzustand und über die in den Spermien gespeicherte Energie.

2.2.1. ATP, ADP und AMP als meßbare Parameter des Spermienstoffwechsels

Im Sperma wurde ATP erstmals von LARDY und PHILIPS (1941) gefunden.
1961 waren NEWTON und ROTHSCHILD die Ersten, denen es gelang, alle drei Nucleotide in den Samenzellen zu messen. Zahlreiche Autoren (NEWTON und ROTHSCHILD 1961, BRACKETT und WILLIAMS 1967, BROOKS 1971, HOSKINS 1973, PRINZEN 1977, FOULKES und MACDONALD 1979, PFETSCH 1979, KÄHN 1981 a, KÄHN et al. 1982 a) haben inzwischen das Sperma der Haustiere untersucht. Verschiedene Extraktions- und Meßverfahren erbrachten dabei sehr unterschiedliche Ergebnisse. Generell waren im Nativsperma ATP➢ADP➢AMP. Die höchsten Werte wurden von der Mehrzahl der Autoren im Wiederkäuersperma ermittelt.
Die auf 10^8 Spermien bezogenen Werte lagen dabei für:

ATP	zwischen	5,0	und	76,5	nMol
ADP	"	4,1	"	12,0	"
AMP	"	2,0	"	13,5	"

Es wurde eine direkte Korrelation zwischen dem meßbaren Wert für ATP und dem Schätzwert für die Motilität festgestellt.

2.2.2. Bestimmung der Adenosinnucleotide

Zur Bestimmung von ATP, ADP und AMP in den Spermien hat das auf enzymatischen Vorgängen beruhende Biolumineszenzverfahren (BRACKETT und WILLIAMS 1967, BROOKS 197o, 1971, PRINZEN 1977, FOULKES und MACDONALD 1979, PFETSCH 1979, LEIDL 198o, KÄHN 1981 a, b, VELEZ CUEVAS 1982) gegenüber den bislang in Biochemie und Mikrobiologie angewandten analytischen Meßmethoden den Vorteil des geringeren apparativen Aufwands und der höheren Meßgeschwindigkeit (KÄHN et al. 1982 a).
Direkt meßbar ist mit diesem Verfahren jedoch nur das Adenosintriphosphat. Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat müssen zunächst auf enzymatischem Wege zu ATP rephosphoryliert werden.
Im nativen Sperma ist der ATP-Gehalt jedoch durch die Aktivität ATP-abbauender Enzyme im Seminalplasma (PFETSCH 1979) einer ständigen Änderung unterworfen.
Bei der von KÄHN (1981 a,b) und KÄHN et al. (1982 a) beschriebenen Hitzedenaturierung der Spermaproben werden die Adenosinnucleotide aus den Samenzellen extrahiert und die ATP-asen inaktiviert. Dadurch ergibt sich für ATP ein nahezu konstanter Meßwert, womit die Messung von ADP und AMP erst möglich wird.

2.2.3. Adenylsäure-Energie-Ladung

Die Adenosinnucleotide sind die Energielieferanten in allen stoffwechselaktiven Zellen. Der augenblickliche energetische Zustand einer Zelle bzw. Zellpopulation wird nach SWEDES et al. (1975) durch die von ATKINSON und WALTON (1967) definierte "Adenylsäure-Energie-Ladung" (Adenylate energy charge) besser wiedergegeben, als durch die Anteile der einzelnen Nucleotide.

Adenylate energy charge (AEC) stellt einen Quotienten aus den molaren Anteilen der drei Adenosinnucleotide dar. Dem molaren Anteil von ATP und dem halben molaren Anteil von ADP im Zähler, steht die Summe der molaren Anteile aller drei Nucleotide im Nenner gegenüber.

$$AEC = \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Der Wert für AEC kann zwischen null, wenn alles ATP und ADP zu AMP abgebaut ist, und eins bei ausschließlichem Vorhandensein von ATP schwanken und liegt für Nativsperma von Bullen im Mittel bei o,68o (KÄHN et al. 1982 b).
Da in Zellen -unter physiologischen Bedingungen- das Verhältnis der Nucleotidkonzentrationen zueinander nur geringfügig schwankt, läßt eine starke Abweichung des AEC-Wertes auf eine von außen herbeigeführte Änderung der Lebensumstände, ein Absinken unter eine bestimmte Grenze, auf den Zelltod schließen (CHAPMAN et al. 1971, CHAPMAN und ATKINSON 1977, HOLM-HANSEN und KARL 1978).

2.3. Die Biolumineszenz

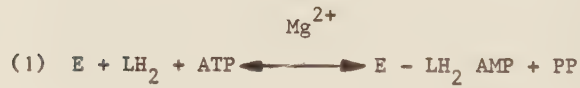
Das Phänomen der Biolumineszenz ist bereits vor Beginn unserer Zeitrechnung bekannt gewesen und vor allem durch DUBOIS im 19. Jahrhundert erforscht worden.

HARVEY (1957) hatte sie erstmalig zum Nachweis von Enzymwirkungen auf den Pflanzenstoffwechsel verwendet. STREHLER und TOTTER (1952) nützten die Entdeckung MCELROY's (1947), daß die Leuchtorgane der Glühwürmchen durch ATP angeregt werden, zur Entwicklung eines Analyseverfahrens für die in vitro Bestimmung von Stoffwechselprodukten mit Hilfe der Biolumineszenz.

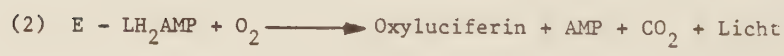
Durch die bei Oxidationsprozessen freiwerdende Energie werden Moleküle in einen angeregten Zustand versetzt (SELIGER 1978). Unter Ausstrahlung von Photonen kehren sie wieder zum energetischen Ausgangspunkt zurück (HAMMER und HIMPSEL 1962).

Das zur Lumineszenzmessung verwendete Verfahren beruht auf dem bislang besterforschten System der amerikanischen Feuerfliege (photinus pyralis).

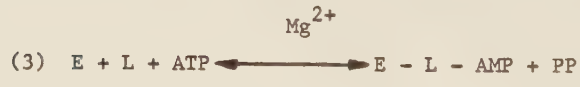
Die lichterzeugende Reaktion läuft folgendermaßen ab:



(1) $E + LH_2 + ATP \xleftrightarrow{Mg^{2+}} E - LH_2\,AMP + PP$



(2) $E - LH_2AMP + O_2 \longrightarrow \text{Oxyluciferin} + AMP + CO_2 + \text{Licht}$



(3) $E + L + ATP \xleftrightarrow{Mg^{2+}} E - L - AMP + PP$

(DELUCA 1976, DELUCA und MCELROY 1978)

(LH_2 = Luciferin)

(E = Luciferase)

(L = Dehydroluciferyladenylat)

(PP = Pyrophosphat)

Sie kann durch Änderungen des Reaktionsmiliems, wie z.B. einem pH-Wert der vom Optimum 7,75 abweicht, gestört werden. Monovalente Anionen (kompetitiv) und hohe Konzentrationen von Reaktionsprodukten hemmen den Reaktionsablauf.

3. Material und Methode eigener Untersuchungen

3.1. Untersuchungsmaterial

Natives Bullensperma sowie solches nach dem Tiefgefrieren und Wiederauftauen dienten als Untersuchungsmaterial. Spermaspender waren Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh der Besamungszentrale des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V..Sie waren nach Alter, vererbter Leistung und bisherigem Befruchtungsergebnis, gemessen an der Non Return-Rate nach 6o-9o Tagen (NRR 6o/9o), ausgesucht. Die Gruppe der Altbullen (Alter zwischen 6 und 12 Jahren) war nach der Laktationsleistung ihrer geprüften Töchter ausgewählt und nach den letztbekannten Non Return-Raten in je eine Untergruppe mit NRR≥65 % (Gruppe 1) und eine NRR≤65 % (Gruppe 2) unterteilt worden.
Bei den Jungbullen (Gruppe 3) handelte es sich um Bullen im Prüfungseinsatz. Daher waren weder NRR noch Töchterleistung vorhanden. Die Auswahl war also rein zufällig. Von den elf Altbullen und den sechs Jungbullen wurden insgesamt 122 Ejakulate untersucht und zu diesen 19o87 Erstbesamungen erfaßt (s. Tabellenanhang S. 52 - 56, Tabellen 1 - 5).

3.1.1. Spermagewinnung

Die Spermagewinnung erfolgte mit Hilfe der künstlichen Scheide im Rahmen des Routinebetriebes. Als Deckpartner dienten sogenannte Standbullen der Besamungszentrale. Das Sperma wurde in einem doppelwandigen Tulpenglas

aufgefangen, zwischen dessen Wänden Wasser mit einer Temperatur von +27° C eingefüllt worden war, um eine Schädigung des Spermas durch Kälteschock zu vermeiden.

3.1.2. Voruntersuchung des Spermas

Vor Beginn der Tiefgefrierkonservierung wurde jedes Ejakulat nach Volumen, Farbe, Konsistenz und Wolkenbildung beurteilt. Die mikroskopische Voruntersuchung schloß sich an. Nach der subjektiven Bewertung der Bewegung aller Spermien (Massenbewegung) erfolgte die Schätzung des Prozentsatzes der Samenzellen mit Vorwärts-, Orts- oder pathologischer Bewegung sowie der Anteile toter oder mißgebildeter Spermatozoen.
Zur Ermittlung der Spermadichte (Spermienzahl/mm^3) fand ein Partikelzählgerät Verwendung. Die Meßwerte wurden mit der Zählkammer (nach TÜRK) überprüft.
Entsprachen die bei der makroskopischen und mikroskopischen Voruntersuchung geschätzten und gemessenen Werte den als Mindestanforderungen vorgegebenen Normen, so konnte die Tiefgefrierkonservierung eingeleitet werden. Die Mindestanforderungen betrugen: Massenbewegung sehr gut, Vorwärtsbeweglichkeit 7o %, Volumen 2 ml und Dichte $o,75x1o^6$ Spermien/mm^3. Dichte und Volumen des Ejakulates mußten jedoch so groß sein, daß sich rechnerisch mindestens 1oo Dosen Samen mit einem Volumen von o,5 ml und einer Dichte von $6ox1o^3$ Spermien/mm^3 ergaben. Insgesamt wurden ca. 1o % der Ejakulate eleminiert. Dabei waren nur die Regelungen der Besamungsstation maßgebend.

3.1.3. Verdünnung und Konfektionierung

Nach dem Abkühlen auf +2o° C wurde das Sperma verdünnt. Bei vorgegebener Anzahl von Spermien pro Besamungsdosis (in der Regel 3o Mio. Spermien, in einigen Ausnahmen 2o Mio. Spermien pro o,5 ml) ergab sich die hinzuzufügende Verdünnermenge aus den für Volumen und Dichte im Nativejakulat ermittelten Werten. Das errechnete Verdünnervolumen wurde zu gleichen Teilen auf Verdünner I und Verdünner II verteilt. Verdünner I, ein Eigelb-TRIS-Verdünner, hatte folgende Zusammensetzung:

-Trishydroxymethylaminomethan	24,22 g
-Zitronensäure	13,6o g
-Fruktose	1o,oo g
-Eigelb	2oo,oo g
-Streptomycin	1,oo g
-Penicillin	1 Mio I.E.
-aqua bidest	ad 1ooo,oo g

und wurde unfraktioniert zugegeben.

Verdünner II enthielt zusätzlich 12 % Glycerin. Wegen seiner spermienschädigenden Wirkung mußte er möglichst schonend, d.h. tropfenweise unter ständiger Rührbewegung dem vorverdünnten Sperma beigemischt werden. Die Glycerinkonzentration in der Endverdünnung betrug 6 %.

Mit einer automatischen Abfüll- und Verschließanlage (CASSOU) wurde das verdünnte Sperma in mittlere Pailletten mit einem Volumen von o,5 ml abgefüllt. Alle bisherigen Verarbeitungsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

3.1.4. Abkühlen und Adaption

Zur anschließenden Abkühlung und Adaption wurden die Pailletten auf Rappen gelegt. Um einen zu raschen Temperaturwechsel zu vermeiden, wurden sie in geschlossenen Behältern in den Kühlraum mit einer Temperatur von +5° C verbracht. Die Behälter wurden nach ca. 15 Minuten geöffnet.
Die Adaptionszeiten lagen zwischen 7 und 16 Stunden. Sie wurden auf Grund von Erfahrungswerten für die einzelnen Bullen vom verantwortlichen Stationstierarzt festgelegt.

3.1.5. Tiefgefrieren und Wiederauftauen

Die Pailletten mit dem auf +5° C abgekühlten und adaptierten Sperma wurden zum Tiefgefrieren zunächst in den über der Oberfläche von flüssigem Stickstoff stehenden Dampf gehängt und nach ca. 10 Minuten in die Flüssigkeit versenkt.
Nach einer Einlagerungszeit von mindestens 17 Tagen wurden von jedem zu untersuchenden Ejakulat zwei Pailletten durch 15 Sekunden langes Eintauchen in ein Wasserbad von +38° C wieder aufgetaut, und eine erneute Motilitätsschätzung durchgeführt.

3.2. Messung und Errechnung des ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes im Sperma

3.2.1. Meßprinzip

Als Meßprinzip wurde die Biolumineszenz verwendet. Durch Energiezufuhr -Energielieferant ist hier das ATP- werden Moleküle auf ein höheres Energieniveau gebracht. Bei der Rückkehr zum Ausgangsstadium wird diese Energie in Form von Photonen wieder abgegeben. Diese werden mit Hilfe eines Photodetektors (photomultiplier tube) aufgenommen, in elektrische Spannungen umgewandelt, die nach Verstärkung gemessen und aufgezeichnet werden können.
Die Lumineszenzreaktion wird durch das Enzym Luciferase wie folgt katalysiert:

$$\text{ATP} + \text{D - Luciferin} + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciferase}} \text{Oxyluciferin} + \text{PP} + \text{AMP} / + CO_2 + \text{Licht}$$

3.2.2. Meßgerät

Als Meßgerät fand das Luminometer "1250 - 001" der Firma LKB-WALLAC, Turku, Finnland, Verwendung.
Die kleinste mit diesem Gerät meßbare ATP-Menge beträgt, mit dem von LKB gelieferten Luciferin-Luciferase-System "AMR" (ATP-Monitoring Reagent) laut Herstellerangabe 10^{-12} Mol.

Die Meßwerte werden von einer an das Luminometer angeschlossenen Digital-Display-Unit (LKB 125o - 1o1) in Intervallen von einer oder von zehn Sekunden angezeigt und können gleichzeitig mit dem integrierten Drucker (Datel-DPP-Q7) ausgedruckt werden.
Der Verlauf der Reaktion läßt sich mit einem ebenfalls mit dem Luminometer gekoppelten 1-Kanal-Flachbrettschreiber (1-Channel-Potentiometric Recorder, LKB-221o) aufzeichnen. Im Gesamtmeßbereich zwischen o und 1o ooo mV können verschiedene Teilmeßbereiche eingestellt werden. Die Papiergeschwindigkeit ist zwischen o,1 mm/Min und 1o mm/sek variierbar.

3.2.3. Meßreagenzien

Als Meßreagenz wurde das Luciferin-Luciferase Präparat AMR (ATP-Monitoring Reagent) der Firma LKB (LKB 125o - 122) verwendet, das neben l- und d-Luciferin, Luciferase, Magnesiumacetat und Rinderserumalbumin enthält. Eichsubstanz ist der in dem sogenannten ATP-Monitoring-Kit mitgelieferte ATP-Standard (LKB 125o-122). Beide liegen in lyophilisierter Form vor und sind lt. Herstellerangabe bei $-2o^{o}$ C mehrere Monate haltbar. Zum Gebrauch werden sie in aqua bidest.aufgelöst. Mit einem Volumen von 1o,o ml ergibt der ATP-Standard, lt. Herstellerangabe, eine $1o^{-5}$ molare Lösung, die jedoch wegen der Instabilität der ATP-Moleküle nur im Eisbad für mehrere Stunden konstant zu halten ist.
Das Reaktionsmilieu bildet der TRIS-H_2SO_4-Puffer. Seine Mg^{++} und K^{+}-Ionen werden benötigt, um die Enzyme Pyruvatkinase und Myokinase für die Umwandlung von ADP bzw. AMP zu aktivieren.

Phosphoenolpyruvat liefert die nötigen Phosphatgruppen für die Resynthese von ATP aus ADP und wurde ebenso wie die Enzyme und Reinsubstanzen, welche zur Überprüfung der Meßreaktionen dienen, von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen.

- Die Pyruvatkinase (PK) wird aus Kaninchenmuskel isoliert und in 5o % Glyzerin gelöst. Spezif. Aktivität: 2oo Einh/mg (25°C) Fremdaktivitäten: GK, HK, NADH-Oxidase, ATP-ase, Enolase, LDH, MK ≤ o,o1 %

- Die Myokinase (MK) wird aus Kaninchenmuskel extrahiert und in Ammoniumsulfatlösung suspendiert. Spezif. Aktivität: ca. 36o Einh/mg (25°C) Fremdaktivitäten: ATP-ase ≤ o,o1%

- Das Phosphoenolpyruvat (PEP) liegt als kristallisiertes Mononatriumsalz vor und wird für die Messungen in TRIS-H_2SO_4 gelöst.

Zusammensetzung des TRIS-H_2SO_4-Puffers:

2o mM Trishydroxmethylaminomethan
2 mM EDTA
1o mM Mg SO_4
12,5 mM KCl
H_2SO_4 ad pH 7,75

3.2.4. Vorbereitung der Spermaproben für die Biolumineszenz-Messung

Im nativen Bullensperma wird ATP durch Enzyme, sog. ATP-asen, ständig abgebaut (Kap. 2.2.2.); es ergibt sich daher bei der Biolumineszenzmessung für ATP kein konstanter Wert (PFETSCH 1979, KÄHN 1981 a).Die Messung der beiden anderen Adenosinnucleotide wird dadurch erschwert bzw. unmöglich. Da das Luciferin-Luciferase-System nur durch ATP zur Lichtemission angeregt wird, müssen ADP und AMP zunächst auf enzymatischem Wege in ATP umgewandelt werden. Die Resynthese verläuft dabei langsamer als der Abbau durch die Nucleotidasen. Um diese, die Messung störenden Einflüsse der genannten Enzyme zu unterbinden, müssen sie inaktiviert werden.
Dies geschah in dieser Versuchsreihe durch Hitzedenaturierung, für die folgende Standards galten (KÄHN 1981 a). Das Probevolumen von 2o µl wurde in einem Fiolax-Reagenzglas (8x7o, Schott-Mainz) in einem Wasserbad von 1oo° C eine Minute lang erhitzt, wobei es auf den schnellen Temperaturanstieg ankam.

3.2.5. Messung

3.2.5.1. Messung der ATP-Lumineszenz in erhitztem Sperma

Zur Messung der ATP-Lumineszenz wurde 1 µl des zu untersuchenden erhitzten Spermas in eine Polystyrol-Meßküvette mit 8oo µl TRIS-H_2SO_4-Puffer, 2oo µl AMR und 1o µl des in TRIS-H_2SO_4-Puffer gelösten Phosphoenolpyruvats hinzupipettiert.

Probe, Puffer und Meßreagenzien wurden durch mehrmaliges Aufsaugen und Zurückpipettieren mit einer 1000 µl Pipette durchmischt.
Danach wurde die Meßküvette in die Meßkammer des Luminometers eingesetzt. Die Lumineszenz, in mV angezeigt, konnte unmittelbar darauf vom Digital-Display abgelesen werden.

3.2.5.2. Bestimmung des ADP in erhitztem Sperma

Die Ermittlung des ADP erfolgte in demselben Ansatz, in dem zuvor die ATP-Lumineszenz gemessen worden war. Aufgrund der ATP-Spezifität des Luciferin-Luciferase-Systems war es notwendig, das ADP zunächst auf enzymatischem Wege in ATP umzuwandeln. Sofort nach der ATP-Messung wurden dem Meßansatz 5 µl Pyruvatkinase zugesetzt, die folgende Reaktion katalysierte:

$$\text{ADP + PEP} \xleftarrow[Mg^{++}\ K^{+}]{\text{Pyruvatkinase}} \text{Pyruvat + ATP (BERGMEYER 1974)}$$

Es kam zu einem Lumineszenzanstieg, der nach ca. 5 Minuten ein Maximum erreichte. Dieser Wert entspricht der Summe aus primärem und dem durch die Pyruvatkinase aus dem ADP resynthetisierten sekundären ATP. Die Differenz aus Gesamtlumineszenz und dem für das primäre ATP gemessenen Wert entspricht daher dem ADP.

3.2.5.3. AMP-Bestimmung in erhitztem Sperma

Da die Lichtemission der verwendeten Biolumineszenzreagenzien nur durch das ATP angeregt wird, mußte auch das AMP zunächst in ATP verwandelt werden (Kap. 3.2.4.). Dies geschieht enzymatisch in zwei Schritten:

$$\text{I} \quad \text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow[Mg^{++}\ K^{+}]{\text{Myokinase}} 2\ \text{ADP}$$

$$\text{II} \quad 2\ \text{ADP} + 2\ \text{PEP} \xrightarrow[Mg^{++}\ K^{+}]{\text{Pyruvatkinase}} 2\ \text{ATP} + 2\ \text{Pyruvat}$$

Aufgrund der Eigenlumineszenz der Myokinase war es erforderlich, diese Messung in einem gesonderten Ansatz durchzuführen: 8oo µl Puffer (TRIS-H_2SO_4), 2oo µl AMR, 1o µl PEP sowie 5 µl PK und 5 µl MK pipettiert man in eine Meßküvette und läßt sie bis zum Lumineszenzmaximum vorreagieren. Dieser als "background" bezeichnete Wert wird bei der anschließenden Ermittlung des AMP berücksichtigt. Nach der Vorreaktion der Meßreagenzien wurde dem Ansatz 1 µl der zu untersuchenden Probe zugegeben und mit ihm durchmischt. Die Lichtemission stieg langsam an und erreichte nach ca. 3o Minuten den Höchstwert. Dieser gibt die Summe der Lumineszenzen von ATP, ADP, AMP und des "background" wieder.
Das AMP erhält man durch Subtraktion der zuvor gemessenen Werte der anderen Reaktionspartner (ATP, ADP und background) von diesem Gesamtmaximum.

3.2.5.4. Errechnung des ATP-, ADP- und AMP-Gehaltes in erhitztem Sperma

Der ATP-Gehalt einer Probe läßt sich aus dem Vergleich der Lumineszenzwerte der Probe und eines Standards wie folgt berechnen:

$$\text{ATP-Gehalt einer Probe} = \frac{\text{Lumineszenz Probe (mV)} \times 1 \times 10^{-11}\text{M ATP}^{x}}{\text{Lumineszenz ATP-Standard (mV)}}$$

^{x} in vorliegender Untersuchung entspricht 1 µl ATP-Standard = 10^{-11} Mol ATP

Bei einer getrennten Vergleichsmessung von Probe und Standard kann es durch ein unterschiedliches Reaktionsmilieu (verschiedene pH-Werte, Nucleotidasen, differierende Ionen-Konzentrationen) zu einer veränderten Biolumineszenzfähigkeit und damit zur Verfälschung der Meßergebnisse kommen. Dies wird bei der internen Standardisierung vermieden. Probe und Standard werden nacheinander in demselben Ansatz gemessen. Die Differenz zwischen der Summe von Probe und Standard und dem zuvor gemessenen "lightoutput" der Probe gibt die Lumineszenz des Standards wieder.
Es ist üblich den ATP-Gehalt des Spermas in nMol bezogen auf 10^{8} Spermien anzugeben.
ADP- und AMP-Gehalt der Samenzellen werden analog berechnet.
Der Gehalt der Adenosin-Nucleotide in den Spermien wurde sowohl im nativen Sperma als auch nach mindestens 17tägiger Einlagerung im wiederaufgetauten Tiefgefriersperma ermittelt.

Nach einer vierstündigen Erwärmung des wiederaufgetauten Spermas auf +38,5° C wurden die Lumineszenzwerte für ATP, ADP und AMP erneut gemessen und daraus die Anteile der Adenosinnucleotide in den Spermatozoen berechnet.

3.2.6. Angewandte statistische Methoden

Die Non Return-Ergebnisse wurden von dem in der Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch verwendeten EDV-Programm RKB-1o5 erfaßt. Es liefert monatlich die Informationen über die Zahl der Erstbesamungen und Non Return-Raten nach 6o/9o und 3o/6o Tagen. Diese sind aufgeteilt nach Rassen, die Rassen aufgegliedert in Alt- und Jungbullen. Innerhalb der Bullen-Altersgruppen sind die Angaben differenziert nach der Konfektionsart und diese wiederum aufgeschlüsselt für die einzelnen Ejakulate. Für jedes Ejakulat sind die Daten von Ejakulat-Nr. (Tag, Jahr), Dichte des Spermas und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien (%) gespeichert (s. Tabellenanhang S. 52 u. 57, Tabellen 1 u.6). Schätz- und Meßergebnisse wurden varianzanalytisch untersucht. Die Werte der Gruppen wurden untereinander mit dem "t-Test" (ATP, ADP, AMP) bzw. "Scheffé-Test" (WINER 1962) für die übrigen Parameter verglichen. Die Korrelationen zwischen NRR und den Schätz- und Meßwerten der Parameter (Regressionsanalyse) wurden mit Hilfe des EDV-Programmpaketes SPSS8 CDC-Version berechnet. Die Grafiken beruhen auf einer "Maximum likelihood" Schätzung, basierend auf der Regressionsanalyse (NORUSIS 1979).

4. Ergebnisse

4.1. Adenosinnucleotide

4.1.1. Adenosintriphosphat (ATP)

Der mittlere Adenosintriphosphat-Gehalt der Samenzellen im Nativsperma lag für alle untersuchten Ejakulate bei 17,97 nMol/$1o^8$ Spermatozoen. In den einzelnen Gruppen betrug er:

Gruppe 1: 17,64 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 17,17 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 19,91 nMol/$1o^8$ Spermien

Der ATP-Wert im Nativsperma der Jungbullen (Gruppe 3) unterschied sich signifikant ($p = o,o5$) von dem Vergleichswert der beiden Altbullengruppen (s. Tabellenanhang S.58, Tabelle 7).

Nach dem Tiefgefrieren und Wiederauftauen war der durchschnittliche ATP-Gehalt auf 9,29 nMol/$1o^8$ Spermien gesunken, was etwa 52 % des Anfangsgehaltes entspricht. Zwischen den einzelnen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied (s. Tabellenanhang S. 58, Tabelle 7). Für die einzelnen Gruppen ergaben sich folgende ATP-Anteile:

Gruppe 1: 9,98 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 9,1o nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 8,68 nMol/$1o^8$ Spermien

Die Erwärmung des wiederaufgetauten Tiefgefrierspermas auf +38,5° C über einen Zeitraum von 4 Stunden führte zu einer weiteren Verringerung des ATP-Wertes auf einen Mittelwert von 8,35 nMol/$1o^8$ Samenzellen (46 % des Ausgangswertes).

Auch hier ergab sich keine statistisch signifikante Differenz zwischen den einzelnen Gruppen (s. Tabellenanhang S. 58, Tabelle 7).

Gruppe 1: 8,91 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 2: 7,95 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 3: 8,31 nMol/10^8 Spermien

4.1.2. Adenosindiphosphat (ADP)

Der Mittelwert für den ADP-Anteil im Nativsperma betrug mit 16,35 nMol/10^8 Spermien etwa 91 % des ATP-Wertes. Für die einzelnen Gruppen wurden folgende Werte errechnet:

Gruppe 1: 16,95 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 2: 16,21 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 3: 15,76 nMol/10^8 Spermien

Verdünnen, Konfektionieren, Tiefgefrieren und Wiederauftauen reduzierten diesen Wert um ungefähr ein Drittel. Durchschnittlich wurden 10,75 nMol/10^8 Spermien gefunden. Das sind ca. 66 % des im frisch gewonnenen Sperma ermittelten Adenosindiphosphat-Gehaltes (s. Tabellenanhang S. 58, Tabelle 7). Im einzelnen ergaben sich für die Gruppen folgende Anteile:

Gruppe 1: 11,43 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 2: 10,49 nMol/10^8 Spermien
Gruppe 3: 10,27 nMol/10^8 Spermien

Bei der dritten Messung nach vierstündiger Wärmebelastung konnten mit 8,04 nMol/10^8 Spermien im Mittel noch ca. 49 % des vor den Verarbeitungsprozessen errechneten ADP-Anteiles nachgewiesen werden.

Der ADP-Gehalt in den Samenzellen betrug für die einzelnen Gruppen:

Gruppe 1: 8,32 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 7,76 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 8,16 nMol/$1o^8$ Spermien

Die Unterschiede zwischen den drei Bullengruppen waren nicht signifikant. (s. Tabellenanhang S. 58, Tabelle 7)

4.1.3. Adenosinmonophosphat (AMP)

Im nativen Sperma waren im Durchschnitt 11,3o nMol AMP pro $1o^8$ Spermien enthalten. Das entspricht 63 % des ATP-Wertes. In den einzelnen Gruppen ergab sich ein AMP-Anteil von:

Gruppe 1: 12,32 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 1o,98 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 1o,43 nMol/$1o^8$ Spermien

Tiefgefrierkonservierung und Wiederauftauen verminderten den AMP-Gehalt der Samenzellen um über die Hälfte auf durchschnittlich 5,38 nMol/$1o^8$ Spermien. Für die einzelnen Gruppen wurden folgende Werte ermittelt:

Gruppe 1: 6,o2 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 4,91 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 5,39 nMol/$1o^8$ Spermien

Nach der Wärmebelastung waren im Mittel noch 3,78 nMol pro $1o^8$ Spermien vorhanden, rund ein Drittel des Anfangsanteiles. Der AMP-Gehalt betrug für die einzelnen Gruppen:

Gruppe 1: 3,56 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 2: 3,56 nMol/$1o^8$ Spermien
Gruppe 3: 4,55 nMol/$1o^8$ Spermien

(s. Tabellenanhang S. 58, Tabelle 7).
Bei den AMP-Werten unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant.

4.1.4. "Adenylate energy charge" (AEC)

Der aus den Meßwerten für die Anteile von ATP, ADP und AMP in den Spermien nach der Definition von ATKINSON und WALTON (1967) gebildete Quotient

$$AEC = \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

als Ausdruck für die Adenylsäure-Energie-Ladung, ließ abweichend von dem Verhalten der Nucleotide, keinen einheitlichen Verlauf für alle am Versuch beteiligten Gruppen erkennen (s. Tabellenanhang S. 52,57,59-61, Tab. 1,6,8-10). In Gruppe 1 und Gruppe 3 verzeichnete der AEC-Wert nach dem Tiefgefrieren und dem Wiederauftauen des Spermas sowie nach der Erwärmung (4 Stunden bei +38,5° C) jeweils einen Anstieg. Dagegen nahm in Gruppe 2 die Adenylsäure-Energie-Ladung nach der Wärmebehandlung des Spermas gegenüber der Zunahme nach dem Wiederauftauen erneut ab.
Zwischen den Gruppen bestand für keinen der AEC-Werte ein signifikanter Unterschied.

4.2. Schätz- und Meßwerte der übrigen Parameter

4.2.1. Ejakulatvolumen

Das Ejakulatvolumen schwankte zwischen 2 ml minimal und 1o ml maximal. Hier gab es große Unterschiede zwischen den einzelnen Bullen und sogar zwischen den Ejakulaten desselben Bullen. Auf die Gruppen der untersuchten Bullen bezogen, konnte festgestellt werden, daß sich die Jungbullen (Gruppe 3 Durchschnitt 4,1 ml) hochsignifikant von den beiden Altbullengruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2 durchschnittliches Ejakulatvolumen 7,1 ml) unterschieden.
(S. Tabellenanhang S. 52 u. 62, Tabellen 1 u.11)

4.2.2. Dichte im Nativsperma

Die durchschnittliche Dichte, d.h. die Anzahl der Spermien pro mm^3 im Nativsperma lag für die Altbullen der Gruppe 1 bei 1,6o Mio., in Gruppe 2 bei 1,56 Mio.
Die Gruppe der untersuchten Jungbullen lag mit einer Dichte von 1,58 Mio. Spermien pro mm^3 zwischen den beiden Altbullengruppen. Der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen war nicht signifikant (s. Tabellenanhang S.52 u.63, Tabellen 1 u.12).

4.2.3. Motilität (prozentualer Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien)

Für die Gesamtheit der untersuchten Ejakulate ergab sich ein Mittelwert von 73,6 % vorwärtsbeweglicher Spermien im Nativsperma.

Während bei den Altbullen für die Anfangsmotilität in beiden Gruppen (Gruppe 1: 73,2 %, Gruppe 2: 72,6 %) annähernd die gleichen Werte geschätzt wurden, lag diese bei den untersuchten Ejakulaten der zum Versuch gehörenden Jungbullen (Gruppe 3) mit 75,7 % erheblich höher (Diff. zu Gruppe 1 und 2 $p \leq 0{,}01$; Tab. 13). Nach Verdünnung, Konfektionierung, Tiefgefrierkonservierung und Einlagerung war im wiederaufgetauten Sperma, bei einem mittleren Schätzwert von 49,6 %, ein erheblicher Verlust im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen, wobei sich zwischen den Gruppen (Gruppe 1: 47,8 %; Gruppe 2: 48,9 %; Gruppe 3: 52,2 %) keine Unterschiede zeigten (Tab. 14).
Anschließend an die Wärmebelastung (4 Stunden bei +38,5°C) wurde der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien im Mittel noch auf 40,5 % geschätzt. Hier lagen die Werte der Altbullengruppe 1 (41,8 %) und der Altbullengruppe 2 (40,1 %) nur geringfügig über denen der Jungbullen der Gruppe 3 (39,5 %; Tab. 16).

4.2.4. Non Return-Ergebnisse (NRR 60/90)

Die durchschnittlichen Non Return-Ergebnisse nach 60 bis 90 Tagen schwankten für die einzelnen Bullen zwischen 58,02 % und 69,64 % (s. Tabellenanhang S. 52, Tabelle 1). Bei den für die einzelnen Gruppen errechneten Mittelwerten unterschied sich Gruppe 2 (62,79 %) signifikant ($p \leq 0{,}05$) von Gruppe 1 (66,49 %) und Gruppe 3 (66,76 %; Tab. 16).

4.3. Non Return-Ergebnisse in Beziehung zu den einzelnen Schätz- und Meßwerten der übrigen Parameter

4.3.1. Non Return-Rate (NRR) und Adenylsäure-Energie-Ladung (AEC)

4.3.1.1. NRR und AEC-Differenz[x]

Für die Wechselbeziehung der Non Return-Ergebnisse zur AEC-Differenz ergab sich sowohl für die am Versuch beteiligten Altbullengruppen als auch für die der Jungbullen eine positive Korrelation.
Je größer also die Differenz zwischen dem Ausgangswert der Adenylsäure-Energie-Ladung im Nativsperma und der "Adenylate energy charge" im Tiefgefriersperma nach Wiederauftauen und Wärmebelastung war, desto besser fiel das zugehörige Befruchtungsergebnis aus (S.3o u. 31, Abb. 1 u.2, S. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o).

[x]AEC-Differenz = AEC im nativen Ejakulat - AEC im Tiefgefriersperma nach Wiederauftauen und Wärmebelastung

Non Return-Raten und AEC-Differenz

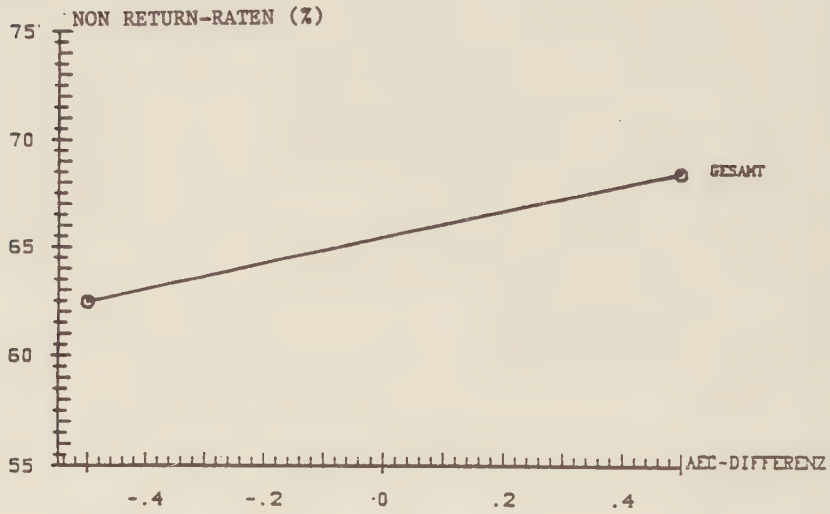


Abb. 1 Non Return-Raten und AEC-Differenz[x]
Gesamtanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC-Differenz, basierend auf der Regressionsanalyse

[x] AEC-Differenz = AEC nativ - AEC nach Wiederauftauen und Wärmebelastung

Non Return-Raten und AEC-Differenz

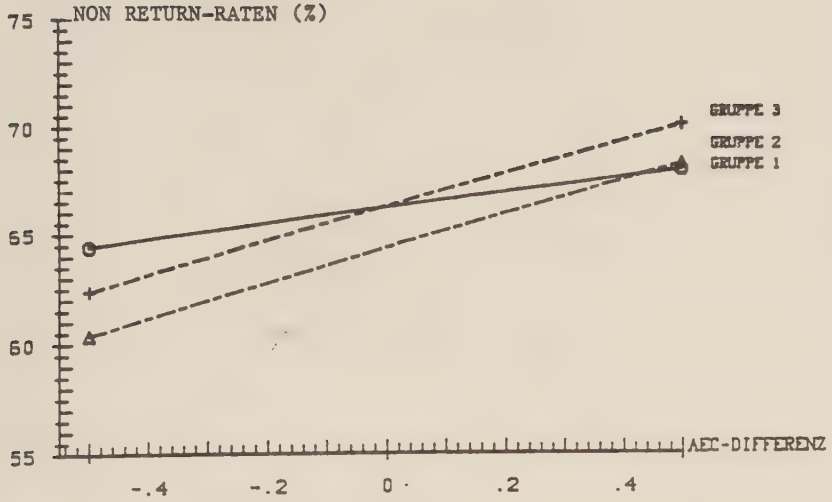


Abb. 2 Non Return-Raten und AEC-Differenz
Einzelanaylse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC-Differenz, basierend auf der Regressionsanalyse
Gruppe 1: O
Gruppe 2: Δ
Gruppe 3: +

4.3.1.2. NRR und AEC im nativen Ejakulat

Für den AEC-Wert im nativen Ejakulat (AEC_o) bestanden für Gruppe 2 und Gruppe 3 etwa gleich starke positive Wechselbeziehungen zum Befruchtungsergebnis. Der vergleichbare Korrelations-Koeffizient für Gruppe 1 fiel sehr schwach negativ aus und war nicht signifikant:

Gesamt: r = o,123o
Gruppe 1: r = ———
Gruppe 2: r = o,2oo7
Gruppe 3: r = o,2o29
p = o,oo1 (gilt für alle Werte)

(S. 33 u. 34, Abb. 3 u. 4, s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

4.3.1.3. NRR und AEC im Sperma nach Tiefgefrierkonservierung und Wiederauftauen

Die Adenylsäure-Energie-Ladung im Sperma nach Tiefgefrierkonservierung und Wiederauftauen und das NR-Resultat korrelierten für die einzelnen Gruppen unterschiedlich miteinander. Einem schwach positiven Koeffizienten der Gruppe 1 stand ein vergleichbarer negativer Wert der Gruppe 3 gegenüber. Für Gruppe 2 ergab sich eine sehr schwach positive Beziehung.

Gesamt: r = ———
Gruppe 1: r = o,1oo9
Gruppe 2: r = o,o424
Gruppe 3: r = -o,1192
p = o,oo1 (gilt für alle Werte)

(S. 35 u. 36, Abb. 5 u. 6, S. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

Non Return-Raten und AEC nativ

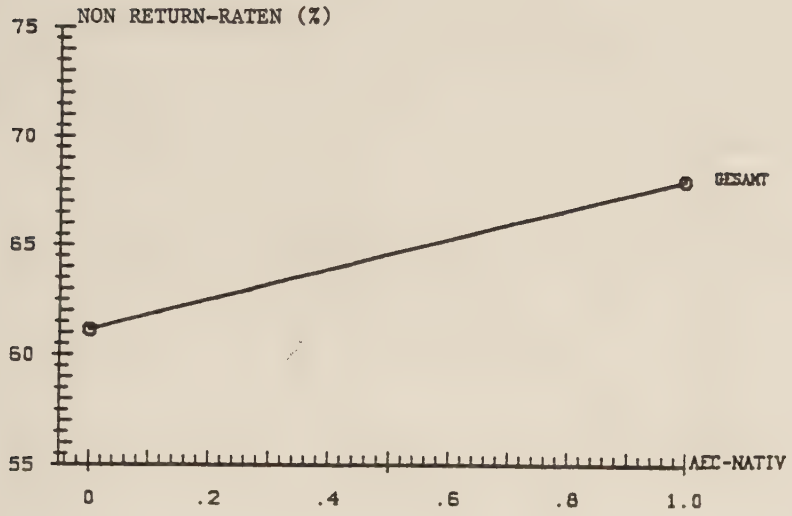


Abb. 3 Non Return-Raten und AEC nativ
Gesamtanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nativ, basierend auf der Regressionsanalyse

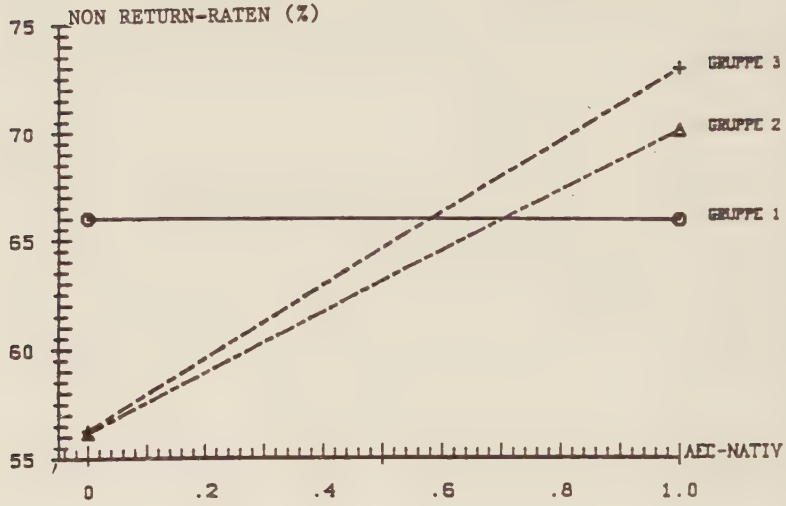


Abb. 4 Non Return-Raten und AEC nativ
Einzelanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nativ, basierend auf der Regressionsanalyse
Gruppe 1: ○
Gruppe 2: △
Gruppe 3: +

Non Return-Raten und AEC nach Wiederauftauen

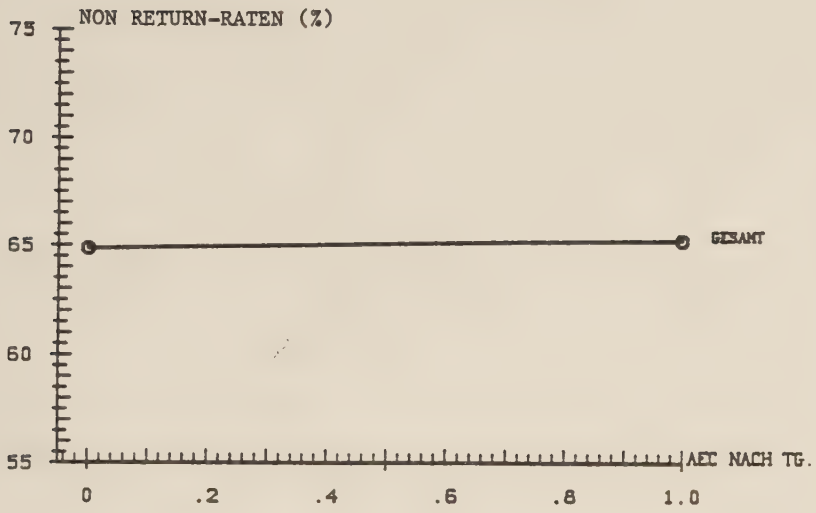


Abb. 5 Non Return-Raten und AEC nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen (n. TG)
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen, basierend auf der Regressionsanalyse

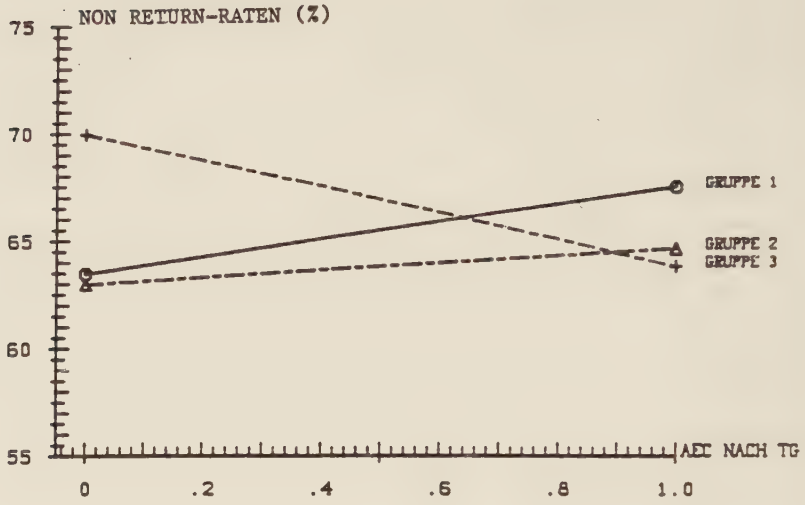


Abb. 6 Non Return-Raten und AEC nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen
Einzelanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen, basierend auf der Regressionsanalyse
Gruppe 1: O
Gruppe 2: Δ
Gruppe 3: +

4.3.1.4. NRR und AEC im wiederaufgetauten Tiefgefriersperma nach Inkubation

Im Verhältnis von "Adenylate energy charge" und Non Return-Ergebnis stellten sich nur für die Adenylsäure-Energie-Ladung (AEC_2) der Samenzellen im Tiefgefriersperma nach Wiederauftauen und Inkubation analoge, negative Beziehungen für alle am Versuch beteiligten Gruppen ein.

Gesamt: r = -o,14o6
Gruppe 1: r = -o,1813
Gruppe 2: r = -o,1226
Gruppe 3: r = -o,1895
$p \leq$ o,oo1 (gilt für alle Werte)

(S. 38 u. 39, Abb. 7 u.8, s. Tabellenhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

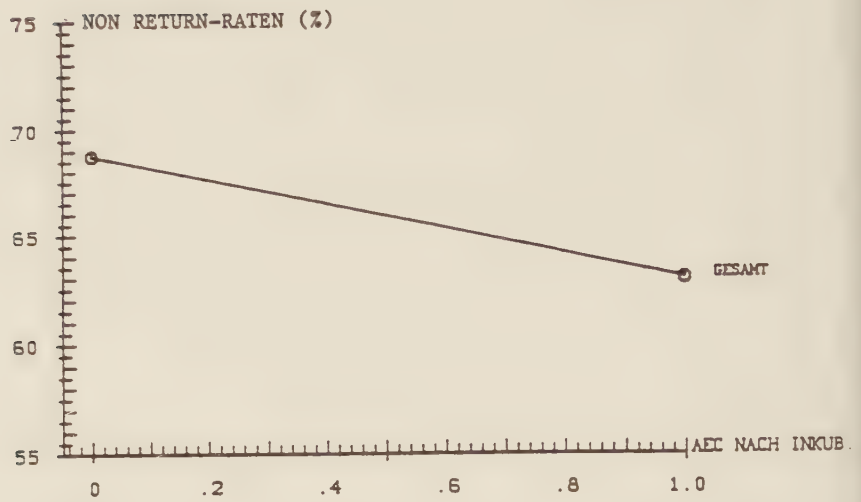


Abb. 7 Non Return-Raten und AEC nach Wärmebelastung
Gesamtanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nach Wärmebelastung, basierend auf der Regressionsanalyse

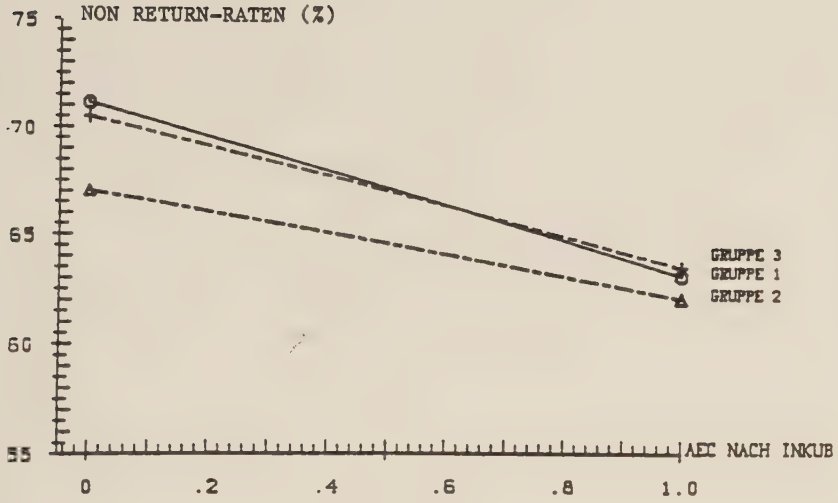


Abb. 8 Non Return-Raten und AEC nach Wärmebelastung
Einzelanalyse für die Gruppen 1,2 und 3
Maximum Likelihood-Schätzung für NRR in Abhängigkeit von AEC nach Wärmebelastung, basierend auf der Regressionsanalyse
Gruppe 1: ○
Gruppe 2: Δ
Gruppe 3: +

4.3.2. Non Return-Rate (NRR) und Adenosinnucleotide

4.3.2.1. NRR und Adenosintriphosphat (ATP)

Nur für die ATP-Anteile in den Spermatozoen des Tiefgefrierspermas nach Wiederauftauen und Erwärmen (4 Stunden bei 38,5°C) bestand für alle untersuchten Ejakulate eine einheitliche negative Wechselbeziehung zu den zugehörigen Befruchtungsergebnissen.
Alle übrigen Adenosintriphosphat-Meßwerte verhielten sich in den einzelnen Gruppen unterschiedlich zu den entsprechenden NR-Prozentzahlen (s. Tabellenanhang S. 72, Tab. 21).

4.3.2.2. NRR und Adenosindiphosphat (ADP)

Beim Vergleich der Meßwerte für ADP mit den korrespondierenden NR-Resultaten zeigten sich mit Ausnahme der Gruppe 1 im Nativsperma negative Beziehungen (siehe Tabellenanhang S. 73, Tab. 22).

4.3.2.3. NRR und Adenosinmonophosphat (AMP)

Dieses Nucleotid verhielt sich umgekehrt wie das Adenosintriphosphat. Für die Beziehung der AMP-Anteile zu den assoziierten Befruchtungsergebnissen ergaben sich nur

für die Meßwerte in den Samenzellen nach Tiefgefrieren, Wiederauftauen und Inkubation gleichartige Korrelationen (s.Tabellenanhang S.74 , Tabelle 23).

4.3.3. Non Return-Rate (NRR) im Verhältnis zu den übrigen Parametern des Spermas

4.3.3.1. NRR und Dichte im Nativsperma

Annähernd in gleichem Maße wie die zunehmende Anzahl der Spermien pro mm^3 im Nativsperma bei den untersuchten Altbullengruppen mit dem Befruchtungsergebnis negativ korrelierte, tat sie dies bei den am Versuch beteiligten Jungbullen im positiven Sinne.

Gesamt: r = ———
Gruppe 1: r = -o,11o8
Gruppe 2: r = -o,117o
Gruppe 3: r = o,14o1
p ≤ o,oo1 (gilt für alle Werte)

(s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

4.3.3.2. NRR und Motilität im Nativejakulat

Zwischen dem Schätzwert für die Motilität im nativen Ejakulat und dem Non Return-Ergebnis, das mit dem daraus hergestellten Tiefgefriersperma erzielt wurde, konnte keine einheitliche, für alle zum Versuch gehörenden

Bullengruppen gültige Wechselbeziehung festgestellt werden. Während zwischen dem prozentualen Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien und dem registrierten NR-Resultat bei Gruppe 2 eine positive Beziehung bestand, gestaltete sich diese für die beiden anderen Gruppen gegenteilig.

Gesamt: r = o,o87o
Gruppe 1: r = ———
Gruppe 2: r = o,1521
Gruppe 3: r = -o,2o71
p = o,oo1 (gilt für alle Werte)

(s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

4.3.3.3. NRR und Motilität nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen

Für die Wechselbeziehung zwischen dem Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermatozoen im Tiefgefriersperma nach dem Wiederauftauen und dem dazugehörigen Non Return-Wert bestand für alle drei Gruppen eine schwache negative Korrelation, wobei nur der Wert für Gruppe 1 (-o,1169; p = o,oo1) signifikant war (s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o).

4.3.3.4. NRR und Motilität nach Inkubation

Auch der dritte auf Schätzung beruhende Parameter, der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im wiederaufgetauten,

4 Stunden bei +38,5° C inkubierten Samen, korrelierte für die einzelnen Gruppen unterschiedlich zu den dazu ermittelten Befruchtungsergebnissen. Einem positiven Verhältnis zwischen Motilitätsschätzwert und Non Return-Ergebnis bei den Altbullen stand ein negatives bei der Gruppe der Jungbullen gegenüber.

Gesamt: r = ———
Gruppe 1: r = ———
Gruppe 2: r = -o,1283
Gruppe 3: r = -o,2517
p ≤ o,oo1 (gilt für alle Werte)

(s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

4.3.3.5. NRR und Ejakulatvolumen

Das Ejakulatvolumen, sowohl bei den untersuchten Altbullen als auch bei den zum Versuch gehörenden Jungbullen verhielt sich reziprok zum betreffenden Befruchtungsergebnis, d.h. je größer das Volumen des nativen Ejakulates war, desto niedriger fiel das mit dem daraus hergestellten Tiefgefriersperma erzielte NR-Ergebnis aus.

Gesamt: r = -o,1964
Gruppe 1: r = -o,2973
Gruppe 2: r = ———
Gruppe 3: r = -o,27o1
p ≤ o,oo1 (gilt für alle Werte)

(s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o)

4.3.4. Non Return-Rate und vererbter Zuchtwert (Laktationsleistung)

Ein für alle am Versuch beteiligten Bullengruppen gültiger Zusammenhang zwischen der Befruchtungsfähigkeit des Spermas und der, bei der Prüfung der Töchter gemessenen, vererbten Laktationsleistung (Milchmenge in kg, Fett und Eiweiß in %) konnte mit den im Versuch gewonnenen Ergebnissen nicht nachgewiesen werden. In Gruppe 1 resultierte zwischen den im Versuch erzielten NR-Ergebnissen und der aufgezeichneten Milchmenge (kg) eine negative, zu den prozentualen Anteilen von Fett und Eiweiß aber eine positive Korrelation. Die vergleichbaren Parameter der Gruppe 2 zeigten entgegengesetztes Verhalten (s. Tabellenanhang S. 68 - 7o, Tabellen 17 - 19).

5. Diskussion

Nach wie vor dient in praxi die Motilitätsschätzung, d.h. die Schätzung des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien, zur routinemäßigen Beurteilung des nativen Ejakulates, als auch des verdünnten Spermas nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen.

In zahlreichen Arbeiten wurde seit einiger Zeit nach einem objektiv zu ermittelnden Parameter gesucht, der geeignet ist, diesen subjektiven Wert zu ergänzen.

Seit es PFETSCH (1979) und KÄHN (1981 a,b) gelang, ein relativ einfaches Meßverfahren zu entwickeln, bei dem mit Hilfe der Biolumineszenz der ATP-Gehalt der Spermien in kurzer Zeit zu ermitteln ist, gewannen die Adenosin-Nucleotide als meßbare Parameter an Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob die Biolumineszenz-Messung von ATP, ADP und AMP für die routinemäßige Beurteilung von Bullensperma geeignet ist und die Meßwerte brauchbare Aussagen über das zu erwartende Befruchtungsvermögen des Tiefgefrierspermas ermöglichen.

Die Schätz- und Meßwerte im nativen Sperma sowie im Tiefgefriersperma nach Wiederauftauen und Wärmebelastung wurden in Korrelation gesetzt zu den Befruchtungsergebnissen (NRR 6o/90) von 19o87 Erstbesamungen (s. Tabellenanhang S. 68 - 74, Tabellen 17 - 23).

Von den mit Hilfe der Biolumineszenz ermittelten Werten für den Gehalt der Samenzellen an Nucleotiden hat sich der aus den Einzelanteilen für ATP, ADP und AMP gebildete Quotient AEC für die Spermabeurteilung hinsichtlich des Befruchtungsvermögens gegenüber den Werten für die einzelnen Nucleotide als überlegen erwiesen. Dies trifft vor allem für die AEC-Werte im nativen Sperma sowie nach Wärmebelastung des wiederaufgetauten Tiefgefrierspermas zu. Für die Wechselbe-

ziehung zwischen AEC im nativen Ejakulat und der mit dem dazugehörigen Sperma erzielten Non Return-Rate ergibt sich eine positive Korrelation, d.h. je größer der AEC-Wert desto besser das Befruchtungsergebnis. Die "Adenylate energy charge" im wiederaufgetauten Sperma nach Wärmebelastung verhält sich entgegengesetzt. Mit zunehmendem AEC-Wert nimmt die Non Return-Rate ab (s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o, Abb. 3,4,7 u.8).

Noch eindeutiger ist die Aussage der Differenz zwischen der Adenylsäure-Energie-Ladung im nativen Sperma und jener im wiederaufgetauten Sperma nach Wärmebelastung. Sie zeigt für alle am Versuch beteiligten Gruppen (Gruppe 1: Altbullen mit NRR über 65%; Gruppe 2: Altbullen mit NRR unter 65%; Gruppe 3: Jungbullen) eine gleich gerichtete positive Beziehung zu den zugehörigen Non Return-Ergebnissen. Je größer die Differenz zwischen AEC im nativen Ejakulat und AEC nach Wiederauftauen und Wärmebelastung desto höher ist die korrespondierende Non Return-Rate (s. Tabellenanhang S. 68-71, Tabellen 17 - 2o, Abb. 1 und 2).Es scheint, daß mit denjenigen Ejakulaten, deren Spermatozoen die Adenylsäure-Energie-Ladung rascher in kinetische Energie umsetzen, die besseren Befruchtungsergebnisse erzielt werden können.

Für das Adenosintriphosphat ergaben sich wechselhafte Bezüge für die einzelnen untersuchten Bullengruppen zu den dazu erfaßten NR-Resultaten. Nur für die Korrelation zwischen den Werten für den ATP-Gehalt in den Spermien des Tiefgefrierspermas nach Auftauen und Wärmebelastung und den korrespondierenden Befruchtungsergebnissen ergab sich ein gleiches Vorzeichen für alle Versuchgsguppen (s. Tabellenanhang S. 72, Tabelle 21).

Die Adenosindiphosphat-Anteile in den Spermatozoen konnten zumindest für die Ejakulate der an diesem Versuch beteilig-

ten Bullen kaum für die Prognose der zu erwartenden Fertilität herangezogen werden. Die Wechselbeziehungen zu den resultierenden NR-Werten waren zu schwach (s. Tabellenanhang S. 73, Tabelle 22).

Ähnlich geringe Aussagekraft war den Meßwerten für das AMP, für die in diesem Versuch erfaßten Ergebnisse zuzubilligen. Von Gruppe zu Gruppe wechselndes Vorzeichen der insgesamt kleinen Korrelations-Koeffizienten für die Anteile im nativen Ejakulat, sowie im Tiefgefriersperma nach dem Auftauen, ließen von diesen beiden Messungen kaum verwertbare Informationen zur Spermabeurteilung hinsichtlich seiner Fertilisationseigenschaften erwarten. Gleichgerichtete, aber doch schwache bis sehr schwache Zusammenhänge zwischen NRR und dem Adenosinmonophosphat-Gehalt der Spermien nach der Wärmebelastung des aufgetauten Tiefgefrierspermas, konnten kaum als Indikator für die Spermaqualität herangezogen werden (s. Tabellenanhang S. 74, Tabelle 23).

Sowohl die Motilität im Nativ-Ejakulat als auch der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien im wiederaufgetauten Tiefgefriersperma nach der Wärmebelastung, standen für die einzelnen Gruppen in widersprüchlicher Wechselbeziehung zu den korrespondierenden NR-Ergebnissen. Lediglich für das Sperma nach Tiefgefrierkonservierung und Wiederauftauen ergab sich eine einheitliche, jedoch sehr schwach negative Korrelation zwischen dem Befruchtungsergebnis (NRR 6o/9o) und dem Anteil sich vorwärtsbewegender Spermien (s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o). Dies zeigte die Problematik der bisher geübten Spermabeurteilung mit Hilfe subjektiver Schätzungen auf.

Zwischen den Meßwerten für die Anzahl der Spermien pro mm^3 im Nativ-Ejakulat und den erzielten Non Return-Resultaten ergab sich keine einheitliche Beziehung für alle am Versuch beteiligten Gruppen. Daher erscheint auch dieser Parameter als Indikator für die zu erwartenden Befruchtungsergebnisse weniger geeignet (s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o).

Das Ejakulat-Volumen verhielt sich sowohl bei den untersuchten Altbullen als auch bei den zum Versuch gehörenden Jungbullen reziprok zum betreffenden Befruchtungsergebnis. Wegen der sehr unterschiedlichen Korrelation zur NRR ist es jedoch ebensowenig als Parameter für das zu erwartende Befruchtungsvermögen zu verwenden (s. Tabellenanhang S. 63 - 71, Tabellen 17 - 2o).

Für die beiden Altbullengruppen zeigten sich widersprüchliche Wechselbeziehungen zwischen dem vererbten Zuchtwert und den NRR. Es kann daher nicht von den Fertilisationseigenschaften des Spermas auf den vererbten Zuchtwert geschlossen werden (s. Tabellenanhang S. 68 - 71, Tabellen 17 - 2o).

Schlußfolgerung

Für die Beurteilung des Befruchtungsvermögens der hier untersuchten Spermaproben erwies sich die AEC-Differenz (=Werte vor dem Tiefgefrieren minus Werte nach dem Tiefgefrieren, Auftauen und Wärmebelastung) als am besten geeignet. Die Korrelation zu den zugehörigen Non Return-Ergebnissen war enger als diejenige zwischen den NR-Raten und den AEC-Werten, die der AEC-Differenz zugrunde liegen. Die Werte der einzelnen Nucleotide waren, für sich alleine betrachtet, von geringerem Informationswert. Bedingt durch die strenge Selektion der für den Einsatz in der künstlichen

Besamung zugelassenen Bullen sowie der zur Konservierung verwendeten Ejakulate und der damit verbundenen geringen Variabilität der einzelnen Parameter der Spermaqualität ergaben sich niedrige Korrelations-Koeffizienten zwischen den Non Return-Ergebnissen und den hier verwendeten AEC-Werten. Die Korrelationen erwiesen sich durch die hohe Anzahl der Einzelwerte als statistisch signifikant ($p \leq 0{,}001$). Es ist jedoch noch zu klären, ob ihnen eine biologische Relevanz zukommt. ELIASSON (1975) fordert dafür ganz allgemein Korrelations-Koeffizienten von $r \geq 0{,}5$. An extrem vorselektiertem Material, wie dies an Besamungsstationen bei den verwendeten Samenproben der Fall ist, sind so hohe Korrelationen zwischen Spermaparametern und dem Befruchtungsvermögen unwahrscheinlich. Auch die sehr empfindliche Biolumineszenz-Nachweismethode für die Nucleotide führte nur zu den oben aufgeführten niedrigen Korrelationen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie weit es möglich sein wird, daraus für die Praxis der künstlichen Besamung brauchbare Verfahren zur Vorhersage des Befruchtungsvermögens zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Es wurde geprüft, ob sich die Messung der ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen im Sperma mit Hilfe der Biolumineszenz als Routinemethode zur objektiven Spermabeurteilung eignet.
Dazu wurden 122 Ejakulate von 17 Fleckviehbullen (11 Alt- und 6 Jungbullen) gewonnen und untersucht.
Neben den gebräuchlichen Parametern der Samenqualität wurden die Anteile der Adenosinnucleotide ATP, ADP und AMP in den Spermatozoen des Nativ-Ejakulates, des Tiefgefrierspermas nach dem Wiederauftauen sowie wiederaufgetauten Tiefgefrierspermas nach Wärmebelastung (4 Stunden bei +38,5° C) mit der Biolumineszenzmethode ermittelt. Aus den Meßwerten für ATP, ADP und AMP wurde nach der Definition von ATKINSON und WALTON (1967) der Quotient AEC

$$\left(= \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP} \right)$$

gebildet.
Schätz- und Meßwerte der Parameter wurden mit den NR-Ergebnissen von 19087 korrespondierenden Erstbesamungen verglichen. Dabei zeigte sich, daß die subjektive Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Samenzellen sowohl im Nativ- als auch im aufgetauten Tiefgefriersperma sich ebensowenig für die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit des Ejakulates eignet wie die Konzentrationen der einzelnen Adenosinnucleotide.
Dagegen ließen die AEC-Werte, besonders die im nativen und aufgetauten Tiefgefriersperma nach Wärmebelastung, eine wesentliche engere Beziehung zu den zugehörigen Befruchtungsergebnissen erkennen.
Eine stärkere lineare Korrelation bestand zwischen der Differenz dieser AEC-Werte und den erzielten NR-Resultaten.

7. Summary

Bioluminescense measurements of ATP, ADP and AMP in semen evaluation

It was investigated whether the measurement of ATP, ADP and AMP-concentrations in spermatozoa with bioluminescense could be used for routine objective semen evaluation. For this purpose, 122 ejaculates from 17 Simmentaler (11 old bulls, 6 young bulls) were collected and evaluated. Beside the usual parameters for semen quality, ATP, ADP and AMP concentrations of sperm were measured by the bioluminescense procedure in the native ejaculate, in deep-frozen semen after thawing, as well as in heat treated (4 hrs. at +38.5°C) spermatozoa.

The AEC (Adenylate Energy Charge) was calculated according to the definition of ATKINSON and WALTON (1967):

$$AEC \quad \left(= \frac{ATP + 1/2\ ADP}{ATP + ADP + AMP} \right)$$

Data obtained by estimation and measurement were compared with the NR-results of 19.087 corresponding first inseminations. The subjective estimation of progressive motile sperm was found to be just as little of value for predicting the fertility of the ejaculate as was in the concentration of the single adenosinnucleotides. On the other hand, the AEC values, especially for the native ejaculate and deep frozen sperm after thawing, showed a better correlation to the NR-results.

A stronger linear correlation was found in the difference of these AEC-values to the obtained NR-results.

8. Tabellenanhang

Tabelle 1: Spermaqualität (Volumen, Dichte, Vorwärtsbeweglichkeit), AEC-Werte und Non Return-Raten für die Ejakulate der untersuchten Bullen

	Bulle	Anzahl der Ejakulate	Volumen (ml)		Dichte 10^6 Sp./mm^3		Vorwärts-beweg. %		AEC nativ		Anzahl der Erstbesam.	NRR in % 6o/9o Tage	
			$\bar{X}$	±S	$\bar{X}$	±S	$\bar{X}$	±S	$\bar{X}$	±S		$\bar{X}$	±S
Gruppe 1	1	6	7,1	1,7	1,69	o,4o	75,o	4,47	o,59	o,o9	1149	65,39	5,19
	2	8	8,o	1,5	1,91	o,34	74,4	3,2o	o,53	o,14	198o	65,63	2,47
	3	7	6,7	2,o	1,75	o,31	74,2	2,o4	o,5o	o,11	12oo	67,93	2,97
	4	7	7,4	2,4	1,5o	o,12	72,1	3,13	o,59	o,o3	1128	64,37	4,95
	5	7	6,o	2,4	1,12	o,18	7o,7	1,89	o,65	o,1o	812	69,29	9,14
Gruppe 2	6	9	7,1	1,3	1,79	o,36	69,5	1,58	o,59	o,o6	2o49	62,84	4,51
	7	8	6,6	2,o	1,61	o,35	73,6	3,78	o,54	o,o8	1494	65,51	3,54
	8	7	7,4	1,2	1,o7	o,2o	71,4	3,78	o,55	o,o6	88o	62,5o	2,74
	9	6	7,6	1,2	1,54	o,18	71,7	2,58	o,55	o,o5	12o7	67,o9	2,42
	1o	7	8,9	1,4	1,5o	o,47	75,o	5,oo	o,56	o,o6	1811	61,68	4,33
	11	7	5,3	1,6	1,69	o,44	75,o	2,67	o,56	o,o5	929	58,o2	2o,2o
Gruppe 3	12	9	4,3	o,6	1,56	o,39	75,o	3,54	o,58	o,o6	892	69,3o	9,28
	13	7	4,6	1,3	1,34	o,51	77,1	3,93	o,63	o,o8	695	65,87	3,13
	14	6	4,o	o,7	1,78	o,24	75,8	2,o4	o,64	o,o5	642	69,64	2,8o
	15	7	3,6	o,6	1,6o	o,54	75,7	4,o1	o,56	o,o8	597	62,42	6,o6
	16	7	3,6	o,6	1,39	o,54	72,1	4,o1	o,62	o,o8	633	67,64	6,o6
	17	7	4,6	1,1	1,82	o,49	78,6	2,44	o,62	o,o4	989	65,32	5,o8

Tabelle 2 : Laktationsleistung der Töchter der untersuchten Bullen

	Bulle	Milch (kg)	Fett (%)	Eiweiß (%)
Gruppe 1	1	4346	3,94	3,51
	2	4296	3,95	3,53
	3	42o6	4,o3	3,47
	4	4o26	3,95	3,43
	5	3917	4,o4	3,56
Gruppe 2	6	4135	4,o9	3,54
	7	4253	4,o3	3,45
	8	4o45	4,19	3,44
	9	4428	3,86	3,47
	1o	4199	4,o8	3,51
	11	4443	3,84	3,47

Tabelle 3 : Laktationsleistungen (Milch in kg) der geprüften Töchter - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	1	151478,812	151478,812	6,431	$\leq 0,05$
innerhalb der Gruppen	78	1837295,876	23555,075		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	4155,32	165,74
Gruppe 2	46	4243,35	143,82

Tabelle 4 : Durchschnittlicher Fettgehalt (%) der Milch der geprüften Töchter-Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	1	0,030	0,030	3,063	$> 0,05$
innerhalb der Gruppen	78	0,753	0,010		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	3,98	0,04
Gruppe 2	46	4,02	0,12

Tabelle 5 : Durchschnittlicher Eiweißgehalt (%) der Milch der geprüften Töchter - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	1	0,006	0,006	3,767	$>0,05$
innerhalb der Gruppen	78	0,134	0,002		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	3,50	0,05
Gruppe 2	46	3,48	0,04

Tabelle 6: Spermakonzentrationen in den Pailletten sowie Vorwärtsbeweglichkeit und AEC-Werte nach Wiederauftauen bzw. nach Wiederauftauen und Wärmebelastung des tiefgefrorenen Spermas

	Bulle	Spermienkonzentration in den Pailletten ($10^3/mm^3$)	Vorwärtsbeweg. % nach dem Wiederauftauen		AEC		Vorwärtsbeweg. % nach Wiederauftauen und Wärmebelastung		AEC	
			$\bar{X}$	$\pm S$	$\bar{X}$	$\pm S$	$\bar{X}$	$\pm S$	$\bar{X}$	$\pm S$
Gruppe 1	1	60	47,5	6,89	0,67	0,06	52,5	4,18	0,70	0,10
	2	60	52,5	5,35	0,66	0,09	44,4	9,04	0,68	0,09
	3	60	45,0	7,75	0,55	0,10	34,2	11,14	0,58	0,11
	4	60	43,6	8,02	0,58	0,14	40,7	3,45	0,62	0,09
	5	60	49,3	8,86	0,62	0,16	37,1	9,51	0,62	0,11
Gruppe 2	6	60	47,0	10,85	0,65	0,11	32,0	5,37	0,68	0,10
	7	60	56,3	4,43	0,66	0,10	47,9	6,99	0,66	0,08
	8	60	50,0	8,16	0,66	0,07	44,3	6,07	0,65	0,08
	9	60	45,8	6,65	0,63	0,06	27,5	9,87	0,49	0,10
	10	54	42,9	9,06	0,60	0,14	40,7	6,72	0,61	0,07
	11	60	50,6	9,04	0,64	0,10	48,8	8,76	0,65	0,11
Gruppe 3	12	60	55,0	2,50	0,57	0,09	38,1	10,33	0,60	0,11
	13	60	50,0	9,57	0,63	0,07	45,0	8,66	0,67	0,12
	14	60	52,5	2,74	0,62	0,07	29,2	7,36	0,55	0,06
	15	60	49,3	7,89	0,63	0,14	51,4	14,34	0,66	0,15
	16	51	48,6	7,89	0,52	0,14	27,9	14,34	0,51	0,15
	17	60	57,1	3,93	0,63	0,07	44,3	6,73	0,69	0,08

Tabelle 7: Mittlerer ATP-, ADP- und AMP-Gehalt ($\bar{X} \pm S$) der Spermien (nmol/10^8 Spermien)
im Nativ-Ejakulat
im Sperma nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen
im aufgetauten Sperma nach Wärmebelastung

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
ATP				
nativ	17,97 ± 4,44	17,64 ± 4,05	17,17 ± 4,68	19,91 ± 3,89
nach TG.	9,29 ± 3,05	9,98 ± 3,01	9,1o ± 2,35	8,68 ± 4,oo
nach Wärmebel.	8,35 ± 3,17	8,91 ± 2,87	7,95 ± 3,17	8,31 ± 3,47
ADP				
nativ	16,35 ± 3,15	16,95 ± 2,47	16,21 + 3,66	15,76 + 2,85
nach TG	1o,75 ± 3,48	11,43 + 3,54	1o,49 + 2,54	1o,27 + 4,62
nach Wärmebel.	8,o4 ± 2,77	8,32 ± 2,97	7,76 + 2,49	8,16 + 2,92
AMP				
nativ	11,3o ± 5,44	12,32 ± 7,67	1o,98 ± 3,69	1o,43 ± 3,96
nach TG	5,38 ± 8,1o	6,o2 ± 7,61	4,91 ± 6,25	5,39 ±11,o3
nach Wärmebel.	3,78 ± 2,78	3,56 ± 2,55	3,56 ± 2,84	4,55 ± 2,81

ATP-Gehalt in den Spermien des Nativ-Ejakulates bei Gruppe 3 signifikant höher ($p \leq o,o5$) als bei den Gruppen 1 und 2 (t-Test)
Für alle übrigen Adenosinnucleotid-Anteile in den Spermien ergaben sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede

Tabelle 8 : AEC im Nativ-Ejakulat - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	0,035	0,018	2,814	$>0,05$
innerhalb der Gruppen	119	0,746	0,006		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	0,57	0,11
Gruppe 2	45	0,57	0,06
Gruppe 3	43	0,60	0,07

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Scheffé -Test)

Tabelle 9 : AEC nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	o,o36	o,o18	1,657	$>$ o,o5
innerhalb der Gruppen	119	1,3oo	o,o11		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	o,62	o,12
Gruppe 2	46	o,64	o,1o
Gruppe 3	42	o,6o	o,1o

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Scheffé -Test)

Tabelle 1o: AEC nach Wiederauftauen und Wärmebelastung - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	o,o12	o,oo6	o,488	$\geq$ o,o5
innerhalb der Gruppen	119	1,45o	o,o12		
	N	$\bar{X}$	$\pm$ S		
Gruppe 1	34	o,64	o,1o		
Gruppe 2	46	o,63	o,1o		
Gruppe 3	42	o,62	o,12		

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Scheffé -Test)

Tabelle 11: Volumen des Nativ-Ejakulates in ml - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	2,481	1,241	47,772	≤ 0,001
innerhalb der Gruppen	119	3,091	0,026		

	N	$\bar{X}$	± S
Gruppe 1	34	7,1	0,20
Gruppe 2	45	7,1	0,18
Gruppe 3	43	4,1	0,09

Das durchschnittliche Volumen des Nativ-Ejakulates ist bei Gruppe 3 signifikant kleiner ($p = 0,001$) als bei Gruppe 1 und 2 (Scheffé-Test)

Tabelle 12: Dichte des Nativ-Ejakulates (10^6 Spermien/mm^3) - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	0,031	0,016	0,086	$>0,05$
innerhalb der Gruppen	119	21,718	0,183		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	1,60	0,39
Gruppe 2	45	1,56	0,41
Gruppe 3	43	1,58	0,47

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Scheffé -Test)

Tabelle 13: Vorwärtsbeweglichkeit (%) der Spermien im Nativ-Ejakulat -Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	235,046	117,523	8,717	≤0,001
innerhalb der Gruppen	119	1604,299	13,482		

	N	$\bar{X}$	$\pm S$
Gruppe 1	34	73,24	3,46
Gruppe 2	45	72,56	3,79
Gruppe 3	43	75,70	3,71

Bei Gruppe 3 war die Vorwärtsbeweglichkeit (%) der Spermien im Nativ-Ejakulat signifikant höher ($p \leq 0,001$) als bei den Gruppen 1 und 2 (Scheffé-Test)

Tabelle 14: Vorwärtsbeweglichkeit (%) der Samenzellen nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	422,356	211,178	3,325	$\geq$ o,o 5
innerhalb der Gruppen	12o	762o,327	63,5o3		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	47,79	7,71
Gruppe 2	46	48,91	9,o6
Gruppe 3	43	52,21	6,84

Kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppen (Scheffé -Test)

Tabelle 15: Vorwärtsbeweglichkeit (%) nach Wiederauftauen und Wärmebelastung - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	99,226	49,613	0,437	$\geq$ 0,05
innerhalb der Gruppen	118	13409,038	113,636		

	N	$\bar{X}$	$\pm$ S
Gruppe 1	34	41,76	9,76
Gruppe 2	45	40,11	10,47
Gruppe 3	42	39,52	11,52

Die Mittelwerte der Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant (Scheffé -Test)

Tabelle 16: Non Return-Raten in % - Varianzanalyse

Varianzquelle	Freiheits-grade	Quadrat-summe	mittlere Quadrate	F-Bruch	p
zwischen den Gruppen	2	428,223	214,112	4,118	≤o,o5
innerhalb der Gruppen	12o	6238,764	51,99o		

	N	$\bar{x}$	± S
Gruppe 1	34	66,49	5,45
Gruppe 2	46	62,79	9,o3
Gruppe 3	43	66,76	6,15

Mittlere Non Return-Rate bei Gruppe 2 signifikant niedriger ($p \leq o,o5$) als bei den Gruppen 1 und 3 (Scheffé-Test)

Tabelle 17: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und den verschiedenen Parametern
Gesamtanalyse für die Gruppen 1, 2 und 3 (n = 19087)

	Volumen nativ	Dichte nativ	Vorwärtsbeweg. nativ	AEC nativ	Spermienkonz. i.d. Pailletten
NR in %	-0,1964	———	0,0870	0,1230	———
	Vorwärtsbeweg. n.Wiederauftauen	AEC nach Wiederauftauen	Vorwärtsbeweg. n.Wärmebelast.	AEC nach Wärmebelast.	AEC-Differenz
NR in %	———	———	———	-0,1406	0,1785
	Milch (kg)	Fett (%)	Eiweiß (%)		
	vererbter Zuchtwert				
NR in %	0,1173	-0,2395	———		

Es sind nur signifikante Korrelationen (p = 0,001) berücksichtigt

Tabelle 18: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und den verschiedenen Parametern
Einzelanalyse für Gruppe 1 (n = 6269)

	Volumen nativ	Dichte nativ	Vorwärtsbeweg. nativ	AEC nativ	Spermienkonz. i.d. Pailletten
NR in %	-o,2972	-o,11o8	———	———	o,o962

	Vorwärtsbeweg. n. Wiederauftauen	AEC nach Wiederauftauen	Vorwärtsbeweg. n. Wärmebelast.	AEC nach Wärmebelast.	AEC-Differenz
NR in %	-o,1169	o,1oo9	———	-o,1813	o,12o5

	Milch(kg)	Fett (%)	Eiweiß (%)
	vererbter Zuchtwert		
NR in %	-o,o793	o,3326	o,2192

Es sind nur signifikante Korrelationen (p = o,oo1) berücksichtigt

Tabelle 19: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und den verschiedenen Parametern
Einzelanalyse für Gruppe 2 (n= 837o)

	Volumen nativ	Dichte nativ	Vorwärtsbeweg. nativ	AEC nativ	Spermienkonz. i.d. Pailletten
NR in %	———	-o,117o	o,1521	o,2oo7	———

	Vorwärtsbeweg. n. Wiederauftauen	AEC nach Wiederauftauen	Vorwärtsbeweg. n.Wärmebelast.	AEC nach Wärmebelast.	AEC-Differenz
NR in %	———	o,o424	o,1283	-o,1226	o,2164

	Milch (kg)	Fett (%)	Eiweiß (%)
	vererbter Zuchtwert		
NR in %	o,381o	-o,37o5	-o,2962

Es sind nur signifikante Korrelationen ($p \leq o,oo1$) berücksichtigt

Tabelle 2o: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und den verschiedenen Parametern Einzelanalyse für Gruppe 3 (n = 4448)

	Volumen nativ	Dichte nativ	Vorwärtsbeweg. nativ	AEC nativ	Spermienkonz. i.d. Pailletten
NR in %	-o,27o1	o,14o1	-o,2o71	o,2o29	———
	Vorwärtsbeweg. Wiederauftauen	AEC nach Wiederauftauen	Vorwärtsbeweg. n.Wärmebelast.	AEC nach Wärmebelast.	AEC-Differenz
NR in %	———	-o,1192	-o,2517	-o,1895	o,227o

Es sind nur signifikante Korrelationen (p = o,oo1) berücksichtigt

Tabelle 21: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und dem Adenosintriphosphat-Gehalt in den Spermien

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
ATP_0	0,0905	0,1681	———	———
ATP_1	———	0,0407	-0,0626	———
ATP_2	-0,0297	-0,0929	———	-0,0620

ATP_0 = im Nativ-Sperma
ATP_1 = nach Verarbeitung, Tiefgefrieren, Einlagerung und Wiederauftauen
ATP_2 = nach Wärmebelastung: 4 Std. bei +38,5° C

$p \leq 0,01$ (Irrtumswahrscheinlichkeit für die angegebenen Korrelations-Koeffizienten)

Tabelle 22: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und dem Adenosindiphosphat-Gehalt in den Spermien

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
ADP_o	-o,o465	o,o411	-o,o985	-o,o811
ADP_1	-o,o318	-o,o973	-o,o3o5	———
ADP_2	-o,o9o6	-o,2771	-o,o478	———

ADP_o = im Nativ-Sperma
ADP_1 = nach Verarbeitung, Tiefgefrieren, Einlagerung und Wiederauftauen
ADP_2 = nach Wärmebelastung: 4 Std. bei +38,5° C

$p = o,o1$ (gilt für alle Korrelations-Koeffizienten)

Tabelle 23: Korrelationen zwischen den Non Return-Ergebnissen und dem Adenosinmonophosphat-Gehalt in den Spermien

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
AMP_o	-o,o711	o,o346	-o,1598	-o,2862
AMP_1	-o,o316	-o,1379	-o,o764	o,o65o
AMP_2	o,1395	o,215o	o,o799	o,o469

AMP_o = im Nativ-Sperma
AMP_1 = nach Verarbeitung, Tiefgefrieren, Einlagerung und Wiederauftauen
AMP_2 = nach Wärmebelastung: 4 Std. bei +38,5°C

$p = o,o1$ (gilt für alle Korrelations-Koeffizienten)

9. Literaturverzeichnis

AMELAR, R.D., L. DUBIN and C. SCHOENFELD (1980): Sperm motility. Fert. Steril. 34/3, 197 - 215

ATKINSON, D.E. and G.M. WALTON (1967): Adenosintriphosphate conservation in metabolic regulation
J. Biol. Chem. 242, 3239 - 3241

BARTOOV, B., D. KALAY and A. MAYEVSKY (1981): Sperm Motility Analyzer (SMA) a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers
Theriogenology 15, 173 - 182

BERGMEYER, H.U. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse
3. Aufl.Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße

BRACKETT, B.G. and W.L. WILLIAMS (1967): ATP content of spermatozoa, semen and seminal plasma
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125, 1133 - 1136

BROOKS, D.E. (1970): Oberservations on the content of ATP and ADP in bull spermatozoa using the firefly luciferase system.
J. Reprod. Fert. 23, 525 - 528

BROOKS, D.E. (1971): Nucleotides in spermatozoa
J. Reprod. Fert. 25, 302 - 303

BUDDECKE, E. (1974): Grundriß der Biochemie
Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin - New York

CHAPMAN, A.G. and D.E. ATKINSON (1977): Adenine nucleotide concentrations and turnover rates
Adv. Microb. Phys. 15, 297 - 301

CHAPMAN, A.G., L.FALL and D.E. ATKINSON (1971: Adenylate energy charge in escherichia coli during growth and starvation
J. Bact. 108, 1072 - 1086

DELUCA, M.A. (1976): Firefly Luciferase
Adv. Enzymol. Relat. Areas Md. Biol. 44, 37 - 68

DELUCA, M.A. and W.D. MCELROY (1978): Purification and properties of firefly luciferase Methods in Enzymology, ed. DELUCA, M.A. 57, 3 - 14,
Acad. Press, New York, San Francisco, London

DOTT, H.M. and G.C.A. FOSTER (1979): The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer
J. Reprod. Fert. (1979) 55, 161 - 166

DUBOIS, R. (1885): Note sur la physiologie de pyrophores
C.R. Soc. Biol. 8, 559 - 572

ELIASSON, R. (1975): Analysis of semen
In: Progress in infertility, II, Eds.: S.J. Behrmann and R.W. Kistner, 691 - 713, Little, Brown and Company, Boston 1975

FOULKES, J.A. and B.J. MACDONALD (1979): The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa
Theriogenology 11, 313 - 319

GIBBONS, B.H. and I.R. GIBBONS (1979): Relationship between the latent adenosine triphosphatase state of dynein 1 and its ability to recombine functionally with KCI`extracted sea urchin sperm flagella.
J. Biol. Chem. 254, 197 - 201

HAMMER, K. and J. HIMPSEL (1962): Lehrbuch der`Physik
Verlag Oldenbourg, München

HARVEY, E.N. (1957): A history of luminescense from the earliest times
The American Philosophical Society, Philadelphia

HOLM-HANSEN, O. and D. KARL (1978): Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and evironmental samples. Methods in enzymology, ed DELUCA, M.A. 57, 73 - 85, Acad. Press, New York, San Francisco, Londen

HOSKINS, D.D. (1973): Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal spermatozoa
J. Biol. Chem. 248, 1135 - 1140

KÄHN, W. (1981 a): Zur ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung mit dem Biolumineszenzverfahren im Sperma einiger Haustiere und des Menschen
Vet. Med. Diss. München

KÄHN, W. (1981 b): Zum ADP- und AMP-Nachweis im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren
Zuchthyg. 16, 76

KÄHN, W., J. PFETSCH und W. LEIDL (1982 a): Methodische Aspekte zur ATP-, ADP- und AMP-Bestimmung im Sperma mit dem Biolumineszenzverfahren
Zuchthyg. 17, 1 - 8

KÄHN, W., J. PFETSCH, W. LEIDL (1982 b): ATP-, ADP- und AMP-Gehalt von Spermien einiger Haustiere und des Menschen sowie von Bullenspermien während der Tiefgefrierkonservierung.
Zuchthyg. 17, 49 - 55

KARLSON, P. (1974): Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Verlag Georg Thieme, Stuttgart

LARDY, H.A. and P.H. PHILLIPS (1941): The interrelation of oxidative and glycolytic processes as sources of energy for bull spermatozoa
Am. J. Physiol. 133, 602 - 609

LEIDL, W. (198o): Neue Aspekte aus der Spermatologie.
3o. Int. Fachtagung "Fortpflanzung und Besamung"
Wels, Österreich

MACHIN, D.E. (1958): Wave propagation along flagella.
J. exp. Biol. 35, 796

MANN, T. (1964): The biochemistry of semen and of the
male reproductive tract
Methuen & Co. Ltd., London

MANN, T. and C. LUTWAK-MANN (1981): Male reproductive
function and semen.
Springer, Berlin, Heidelberg, New York

MCELROY, W.D. (1947): The energy source for biolumines-
cense in an isolated system
Proc. natn. Acad. Sci. 33, 342 - 345

MÜLLER, E. und J. SZILAGYI (1964): Eine fotographische
Methode zur objektiven Beurteilung der Beweglich-
keit der Spermien in verdünnten Bullenejakulaten.
V°Congresso Internazionale per la Riproduzione
Animale e la Fecondazione Artificiale
Trento 4, 335 - 34o

NEVO, A.D. and R. RIKMENSPOEL (1969): Diffusion of ATP
in sperm flagella.
J. theor. Biol. 26, 11 - 18

NEWTON, A.A. and F.R.S. LORD ROTHSCHILD (1961):
Energy-rich phosphate compounds in bull semen:
comparison of their metabolism with anaerobic heat
production and impedance change frequency
Proc. R. Ser. B/115, 183 - 194

NORUSIS, M.J. (1979): SPSS8 Statistical Algorithms Release 8,o, Computer Software for Data Analysis SPSS inc. 27 - 28; 37 - 42

PFETSCH, J. (1979): Zur ATP-Bestimmung im Sperma einiger Haustierarten mit dem Biolumineszenzverfahren Vet. Med. Diss. München

PRINZEN, R. (1977): ATP-Bestimmungen (Adenosin-Tri-Phosphat) mit einer Schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien Zuchthyg. 12, 1o5 - 1o8

REVELL, S.G. and P.D.P. WOOD (1978): A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa J. Reprod. Fert. 54, 123 - 126

SALISBURY, G.W. and N.L. VANDEMARK (1961): Physiology of reproduction and artifical insemination of cattle W.H. Freemann & Co., San Francisco, London

SATIR, P.(1979): Basis of flagellar motility in spermatozoa: current status. In Spermatozoon, 81 - 9o. Ed.: FAWCETT, D.W. and J.M. BEDFORD Urban & Schwarzenberg, Baltimore - Munich

SELIGER, H.H. (1978): Exited states and absolute calibrations in bioluminescense Methods in Enzymology, ed. DELUCA, M.A. 57, 56o - 6oo. Acad. Press, New York, San Francisco, London

STEINER, R., TH. BAUMEISTER, R. HARTMANN, R. KAUFMANN und N. HOFMANN (198o): Motilitätsmessungen von Spermatozoen mit Hilfe der Laser-Doppler-Spektroskopie Zuchthyg. 15, 68- 69

STREHLER, B.L. and J.R. TOTTER (1952): Firefly luminescense in the study of energy transfer mechanisms Arch. Biochem. Biophys. 40, 28 - 41

SWEDES, J.S., R.J. SEDO and D.E. ATKINSON (1975): Regulation of growth and protein synsthese to the adenylate energy charge in an adenine requiring mutant of escherichia coli J. Biol. Chem. 25o, 693o - 6938

VELEZ CUEVAS, G. (1982): Untersuchungen über die Eignung des ATP-, ADP- und AMP-Nachweises mit der Biolumineszenzmethode zur Beurteilung von Tiefgefrierkonservierungsverfahren für Bullenspermien Vet. Med. Diss. München

WINER, B.J. (1962): Statistical principles in experimental Design, McGraw - Hill Book Company, New York 85 - 92

Am 3o.o5.1944	wurde ich als zweiter von drei Söhnen des kaufm. Angestellten Franz Berger und seiner Ehefrau Maria geb. Heger in Neutitschein im Sudetenland geboren.
195o - 1954	Besuch der Volksschulen in Weidenhausen und Naunheim Krs. Wetzlar
1954 - 1965	Goethegymnasium in Wetzlar, Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig
1965 - 1967	Ableisten eines zweijährigen Wehrdienstes
1967 - 1974	Studium der Veterinärmedizin an der Justus Liebig-Universität in Giessen
23.1.1974	Bestehen des Staatsexamens
29.1.1974	Bestallung als Tierarzt
1974 - 1975	Assistent in der Großtierpraxis von Dr. G. Fuchs, Nördlingen
Nov.- Dez. 1975	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Tropische Veterinärmedizin der Justus Liebig-Universität Giessen
1976 - 198o	Angestellter Tierarzt der Deutschen Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) in Eschborn
1976 - 1977	Einsatz im Tierseuchenbekämpfungsprojekt in Niger
1977 - 198o	Veterinärmedizinisches Beratungsprojekt in Jordanien
1981 - 1982	Experimenteller Teil der Dissertation in der Besamungszentrale des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V.
Seit 1.9.1982	Praxisassistent bei Dr. K. Thorausch Lichtenau

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Leidl für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung.

Bei den Direktoren des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V., Herrn Dr. R. Hahn und Herrn W. Breuer möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche sowie für die finanzielle Unterstützung aus Mitteln der Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Kähn sowie Herrn Dr. Velez für die Einführung in die Technik der Biolumineszenzmessung.

Dank für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche auch an Herrn Dr. Zoder und sein Laborpersonal in der Besamungszentrale Neustadt a.d. Aisch.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei Herrn Dr. F. Bauer von der Universität Nürnberg für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse und nicht zuletzt bei Herrn Dr. R. Stolla für die Durchsicht der Arbeit.